

Bestimmung des Raman-Streutensors und symmetrieklassifizierter Verzerrungen der Häm-Gruppe im Myoglobin durch resonante Raman-Streuung in Kristall und Lösung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

Dem Fachbereich Physik/Elektrotechnik
der Universität Bremen
vorgelegt von

Saad El Dine El Naggar
Diplom-Physiker

Gutachter:
Prof. Dr. Wolfgang Dreybrodt
Prof. Dr. Adalbert Mayer-Heinricy

Bremen
1984





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543123_0033

BESTIMMUNG DES RAMAN-STREUTENSORS UND SYMMETRIE-
KLASSIFIZIERTER VERZERRUNGEN DER HÄMGRUPPE IM
MYOGLOBIN DURCH RESONANTE RAMAN-STREUUNG IN
KRISTALL UND LÖSUNG

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Physik/Elektrotechnik
der Universität Bremen

vorgelegt von

SAAD EL DINE EL NAGGAR

Diplom-Physiker

Gutachter:

Prof. Dr. Wolfgang Dreybrodt

Prof. Dr. Adalbert Mayer-Heinricy

Bremen

1984

Das Promotionskolloquium wurde am 26.4.1984 durchgeführt.

Die Prüfer waren:

Prof. Dr. Wolfgang Dreybrodt

Prof. Dr. Adalbert Mayer-Heinricy

Prof. Dr. Wilfried Staude

Prof. Peter Ryder, Ph.D.

ABSTRACT

El Naggar, Saad El Dine

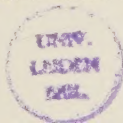
Determination of the Raman Tensor and the Symmetry Classified Distortions of the Haem Group in Myoglobin by Resonance Raman Scattering in Solution and Single Crystals.

We have measured the depolarization ratio and the excitation profiles of the Raman lines at $1,355\text{ cm}^{-1}$, $1,564\text{ cm}^{-1}$ and at $1,373\text{ cm}^{-1}$, $1,580\text{ cm}^{-1}$ in solutions of deoxyMb and ferric MbCN, respectively, in the region between the Soret and the α , β -bands. From their dispersion we have determined the tensor components of the Raman tensor by an extension of Loudon's theory, taking into account static distortions from the ideal D_{4h} -symmetry of the haem group, induced by haem-protein interactions and the interaction of the side-chains with the porphyrin skeleton.

Analogous to the excitation profiles in solution, measurements on Mb single crystals yield intensities $I_{a,b}$ which are related to the tensor components viewed in the laboratory system, spanned by the three orthogonal crystals axes a , b , c^* . By using the structural data of the crystals and coordinate transformation from the system of the molecular coordinates into the laboratory system, the quantities $I_{a,b}$ can be calculated by use of the tensor components determined from the solution data.

The values thus calculated and those which are determined experimentally from the single crystals are in good agreement. This confirms the used theoretical approach.

Additionally to that we have measured the excitation profiles and the depolarization ratio of ferric haemoglobin Cyanid for the Raman lines at $1,373\text{ cm}^{-1}$ and $1,580\text{ cm}^{-1}$ for various pH-values of solution. No pH-dependence of the excitation profiles and the depolarization ratio have been detected for this derivative.



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
I. Einführung	4
1. Das untersuchte System (Hämoglobin (Hb) und Myoglobin (Mb))	4
1.1 Primärstruktur der Proteine	4
1.2 Sekundärstruktur der Proteine	5
1.3 Tertiärstruktur der Proteine	6
1.4 Quartärstruktur der Proteine	8
1.5 Prosthetische Gruppe	8
1.6 Struktur und Aufbau des Mb und Hb	9
1.6.1 Struktur der Hämgruppe	9
1.6.2 Struktur des Myoglobins	11
1.6.3 Struktur des Hämoglobins	11
1.7 Sauerstoffbindung des Myoglobins und des Hämoglobins	14
2. Theoretische Einführung	18
2.1 Einführung in die Ramantheorie	18
2.1.1 Klassische Betrachtung des Polarisierbarkeitstensors	18
2.1.1.1 Beziehung zwischen den Raman-Intensitäten und den Komponenten des Polarisierbarkeitstensors	21
2.1.2 Quantenmechanische Betrachtung des Polarisierbarkeitstensors	25
2.2 Bestimmung des Polarisierbarkeitstensors für das Hämolekül	31
2.2.1 Die elektronischen Übergänge der Hämgruppe	31
2.2.2 Berechnung der Komponenten des Polarisierbarkeitstensors für das Hämolekül aus den Lösungsdaten	35

2.2.3	Beziehung zwischen den gemessenen Intensitätsprofilen von Mb-Kristallen und den Komponenten des Raman-Tensors im Molekülsystem	42
2.2.4	Berücksichtigung der optischen Absorption	47
II. Die experimentelle Methode		50
1.	Präparatives	50
1.1	Präparation der Myoglobinlösungen	50
1.1.1	Herstellung der Stammlösung	50
1.1.2	pH-Wert-Einstellung	50
1.1.3	Herstellung der Derivate	51
1.2	Präparation der Kristalle	51
1.2.1	Kristallzüchtung	51
1.2.2	Herstellung der Mb-Kristallderivate	53
2.	Apparatives	53
2.1	Aufnahme der optischen Spektren	53
2.1.1	Aufnahme der Lösungsspektren	53
2.1.1.1	Apparatur	53
2.1.1.2	Konzentrationsbestimmung	53
2.1.2	Aufnahme der polarisierten optischen Kristallspektren	54
2.1.2.1	Apparatur	54
2.1.2.2	Bestimmung der Kristallachsen	56
2.1.2.3	Aufnahme der polarisierten optischen Spektren	57
2.1.2.4	Die Beziehung zwischen Extinktionskoeffizienten im Kristall und in Lösung	59
2.2	Aufnahme der Raman-Spektren	63
2.2.1	Raman-Apparatur	63
2.2.1.1	Aufbau	63
2.2.1.2	Ermittlung der Transmission des Spektrometers	65
2.2.1.3	Berechnung der vom Spektrometer erfaßten Probendicke	67

2.2.2	Aufnahme der Lösungsspektren	68
2.2.2.1	Geometrie	68
2.2.2.2	Korrektur der Intensität	69
2.2.3	Aufnahme der Kristallspektren	70
2.2.3.1	Geometrie	70
2.2.3.2	Einstellung der Kristallachsen	70
2.2.3.3	Korrektur der gemessenen Intensitäten	73
III. Die experimentellen Ergebnisse		75
1.	Die optischen Absorptionsspektren	75
1.1	Absorptionsspektren der Lösungen	75
1.1.1	Deoxy-Mb	75
1.1.2	Met-Mb-CN	75
1.1.3	Met-Hb-CN	75
1.2	Absorptionsspektren der Mb-Kristalle	78
1.2.1	Deoxy-Mb	78
1.2.2	Met-Mb-CN	78
2.	Die Raman-Spektren	83
2.1	Raman-Spektren von Mb- und Hb-Derivaten in Lösungen	83
2.1.1	Deoxy-Mb	
2.1.1.1	Raman-Spektren im Bereich zwischen 1300 und 1700 cm^{-1}	83
2.1.1.2	Intensitätsprofile und Dispersionskurven des Depolarisationsgrades	85
2.1.2	Met-Mb-CN	89
2.1.2.1	Ramanspektrum zwischen 1300 und 1700 cm^{-1}	89
2.1.2.2	Intensitätsprofile und Dispersionskurven des Depolarisationsgrades	89
2.1.3	Met-Hb-CN	89
2.1.3.1	Raman-Spektrum zwischen 1300 und 1700 cm^{-1}	89
2.1.3.2	Intensitätsprofile und Dispersionskurven des Depolarisationsgrades	94

2.2	Raman-Spektren der Mb-Kristalle	94
2.2.1	Deoxy-Mb	94
2.2.1.1	Raman-Spektrum im Bereich von 0 bis 1700 cm^{-1}	94
2.2.1.2	Raman-Spektren im Bereich von 1300 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} mit verschiedenen Polarisationen	97
2.2.1.3	Die Intensitätsprofile	97
2.2.2	Met-Mb-CN	99
2.2.2.1	Raman-Spektren im Bereich zwischen 0 und 1700 cm^{-1}	99
2.2.2.2	Raman-Spektrum im Bereich zwischen 1300 und 1700 cm^{-1} mit verschiedenen Polarisationen	99
2.2.2.3	Die Intensitätsprofile	99
IV.	Fitverfahren und Auswertung der experimentellen Daten	102
1.	Das Fitprogramm	102
2.	Das Fitverfahren	102
3.	Festlegung des molekularen Koordinatensystems	103
3.1	Berechnung der Richtungskosinus der Hämnormalen aus den Daten der polarisierten optischen Absorption	105
3.1.1	für Deoxy-Mb	108
3.1.2	für Met-Mb-CN	108
3.2	Grobe Festlegung der x- und y-Achsen aus den Atomkoordinaten	109
3.3	Genaue Bestimmung der x- und y-Achsen mit Hilfe des Fitverfahrens	111
4.	Ergebnisse des Fitverfahrens	112
4.1	Deoxy-Mb	112
4.1.1	Fitparameter der Linien 1355 cm^{-1} und 1564 cm^{-1}	112

4.1.2	Richtungskosinus des molekularen Koordinatensystems im Bezug auf das Kristallsystem a, b, c ^a	116
4.2	Met-Mb-CN	117
4.2.1	Fitparameter der Raman-Linien 1373 cm ⁻¹ und 1580 cm ⁻¹	117
4.2.2	Richtungskosinus des molekularen Koordinatensystems im Bezug auf das Kristallsystem a, b, c ^a	117
4.3	Vergleich zwischen Deoxy-Mb und Met-Mb-CN	117
4.4	Met-Hb-CN	118
V.	pH-Abhängigkeit der untersuchten Derivate	120
1.	Deoxy-Mb	120
2.	Met-Mb-CN	120
3.	Met-Hb-CN	120
VI.	Diskussion	
1.	Diskussion des theoretischen Ansatzes und des Fitverfahrens	124
2.	Diskussion der Fitparameter und der symmetrieklassifizierten Verzerrungen des Hämoleküls	128
2.1	Molekülverzerrungen, erhalten aus den Fitdaten der Oxidationsmarkerlinie 1355 cm ⁻¹ (Deoxy-Mb) bzw. 1373 cm ⁻¹ Met-Mb-CN und Met-Hb-CN	128
2.2	Molekülverzerrungen, erhalten aus den Fitdaten der Spinmarkerlinie 1564 cm ⁻¹ (Deoxy-Mb) bzw. 1580 cm ⁻¹ Met-Mb-CN und Met-Hb-CN	130

3.	Kristall-Lösungs -Problem	134
4.	Diskussion der optischen Absorption	135
4.1	Diskussion der Spektren	135
4.2	Hämorientierung	137
4.3	Vergleich zwischen Deoxy-Mb und Met-Mb-CN	138
5.	Diskussion der Abhängigkeit der Intensitätsprofile und der Depolarisationsgrade der Hämkomplexe vom pH-Wert der Lösungen	140
5.1	Das Myoglobinsystem	140
5.2	Das Hämoglobinsystem	142
VII.	Ausblick	147
1.	Erweiterung des theoretischen Ansatzes	147
2.	Druckinduzierte Symmetrie-Verzerrungen	148
3.	Raman-Messungen an Hämproteinen bei tiefen Temperaturen	149
VIII.	Zusammenfassung	150
	Literaturverzeichnis	154
	Anhang I	A1
	Anhang II	A4

Einleitung

Die resonante Raman-Spektroskopie (RRS) hat sich als hervorragende Methode zur Strukturaufklärung von Molekülen und besonders von Makromolekülen, wie Hämproteinen, durchgesetzt. Mit ihrer Hilfe kann man Substanzen insbesondere auch in wäßrigen Lösungen untersuchen, wo andere Methoden, wie z.B. Infrarot-Absorptionsspektroskopie, wegen der starken Absorptionsbanden des Wassers versagen oder schwer durchführbar sind.

Die Hämproteine lassen sich mit der RRS im sichtbaren Bereich leicht untersuchen. Sie besitzen eine funktionelle Gruppe, die Hämgruppe, deren Absorptionsbanden im sichtbaren Bereich liegen. Das Apoprotein absorbiert dagegen im ultravioletten Bereich. Deshalb ist es möglich, das Raman-Spektrum der Hämgruppe ohne Überlagerung durch das sehr viel schwächere Spektrum des Apoproteins zu beobachten.

In dieser Arbeit wird versucht, mit Hilfe der RRS einen Beitrag zum Verständnis der Funktionsweise der Sauerstoffbindung im Hämoglobin und Myoglobin zu leisten. Hier wurde hauptsächlich das monomere Myoglobin untersucht, das als eine Vorstufe des komplizierten tetrameren Hämoglobins zu betrachten ist.

Myoglobin in wäßrigen Lösungen wurde für verschiedene Derivate und jeweils für verschiedene pH-Werte mittels der RRS untersucht.

Ebenso wurden Myoglobinkristalle verschiedener Derivate mit der RRS und außerdem mit Hilfe der polarisierten optischen Absorption untersucht.

Die Intensitätsprofile (IP) und die Depolarisationsgrade (DPG) der Ramanlinien 1355 cm^{-1} und 1564 cm^{-1} des Ramanspektrums des Deoxy-Mb und die der entsprechenden Ramanlinien des Met-Mb-CN zeigen in dem Frequenzbereich zwischen Soret- und α -, β -Banden eine Dispersion. Ausgehend von den theoretischen Behandlungen von Loudon (21), Peticolas et al. (22) und Collins et al. (31),

formulierten Schweitzer et al. (34) den Polarisierbarkeits-tensor als Linearkombination aller Ramantensoren der in der D_{4h} -Symmetrie erlaubten Schwingungsmoden, die sich wie die Darstellungen A_{1g} , A_{2g} , B_{1g} und B_{2g} transformieren. Die Koeffizienten dieses Tensors stehen in linearer Beziehung zu symmetrieklassifizierten Verzerrungen der Hämgruppe aus der idealen D_{4h} -Symmetrie. Diese Verzerrungen werden durch die unterschiedlichen Seitengruppen der Hämgruppe, die kovalente Bindung der Hämgruppe an das Protein und die verschiedenen Kontakte zwischen der Hämgruppe und dem Apoprotein verursacht.

Die Dispersionskurven des Depolarisationsgrades und die Intensitätsprofile können mit diesem Ansatz mittels eines Computer-fitprogrammes gleichzeitig mit einem einzigen Satz von Fitkonstanten angepaßt werden. Die so erhaltenen Fitkonstanten beschreiben den Polarisierbarkeitstensor vollständig. Das Fitverfahren aber benötigt im allgemeinen eine relativ große Anzahl von Fitparametern. Dadurch wird die Eindeutigkeit eines Fitergebnisses in Frage gestellt.

In dieser Arbeit wird anhand neuer Ramanmessungen an Mb-Kristallen diese Methode getestet, um ihre Zuverlässigkeit eindeutig festzustellen.

Wenn der theoretische Ansatz von Schweitzer et al. (34) richtig ist, dann kann man durch das Fitten des Depolarisationsgrades und der Intensitätsprofile einer Ramanlinie eines Hämderivat-Spektrums alle Komponenten des Polarisierbarkeitstensors theoretisch in dem Frequenzbereich zwischen der α -, β - und der Soret-Bande ausrechnen. Dadurch kann man alle experimentellen Ergebnisse der Ramanstreuung an solchen Hämderivaten in diesem Frequenzbereich vorhersagen. Deshalb wurden hier Raman-Messungen an Deoxy-Myoglobin und Met-Myoglobin-Cyanid in Lösung und im Kristall durchgeführt. Aus den Lösungen bekommt man die IP's und die DPG's. Die Ramanmessung an der (axb)-Fläche der Myoglobinkristalle liefert vier Intensitätsprofile, die sich durch die möglichen Orientierungen der Polarisation des Laserstrahles und des gestreuten Ramanlichtes bezüglich der Kristallachsen in dieser Kristallfläche ergeben.

Durch das Fitten der aus der Lösung erhaltenden DPG und IP erhält man den Polarisierbarkeitstensor. Dieser wird zur theoretischen Berechnung der vier Intensitätsprofile des Kristalls verwendet. Hier sollen sieben unabhängige experimentelle Datensätze eines Hämderivates mit einem einzigen Fitparametersatz, erhalten aus den Lösungsdaten, beschrieben werden.

Die Ramanlinien 1355 cm^{-1} und 1564 cm^{-1} in Deoxy-Mb und die entsprechenden Linien in Met-Mb-CN eignen sich besonders für diesen Zweck, da sie zwei verschiedenen Schwingungsmoden einerseits entsprechen und innerhalb des Meßfehlers keine Änderung mit der Variation des pH-Wertes der Lösung andererseits zeigen.

Dies führt zu der Annahme, daß die Hämgruppe in Lösung und im Kristall die gleichen Eigenschaften bezüglich der Ramanstreuung besitzen soll. Diese Annahme wurde durch die sehr gute Übereinstimmung zwischen den experimentell erhaltenen Kristallintensitätsprofilen und den theoretisch aus dem Ramantensor berechneten indirekt bestätigt.

Ergänzend zur RRS an Deoxy-Mb und Met-Mb-CN in Lösungen in dem pH-Bereich zwischen 5.0 und 9.0 wurde Met-Hämoglobin-Cyanid ebenfalls in diesem pH-Bereich untersucht, um einen Vergleich zwischen den beiden Systemen (das monomere Mb und das tetramere Hb) zu ermöglichen. Beide Systeme zeigen bezüglich der RRS eine sehr große Ähnlichkeit.

I. Einführung

1. Das untersuchte System (Hämoglobin (Hb) und Myoglobin (Mb))

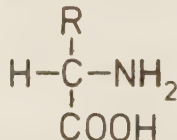
Die Struktur und Funktion der Hämproteine ist vielfach beschrieben worden (Perutz (1), (2), Antonini und Brunori (3), Kendrew (4), Takano (5), (6), Phillips (7), Karlsohn (8)). Hier werden im folgenden nur die zum Verständnis der Problemstellung der Arbeit die wichtigsten Tatsachen wiederholt.

Hämoglobin (Hb) und Myoglobin (Mb) sind Hämproteine, die bei den höheren Lebewesen den für den Stoffwechsel in der Zelle notwendigen Sauerstoff transportieren und speichern.

Mb und Hb sind die bisher hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion mit am ausführlichsten untersuchten biologischen Makromoleküle. Sie gehören ebenso wie die Enzyme zur Kategorie der Proteine, d.h. sie sind aus einem makromolekularen gefalteten Kettenmolekül aufgebaut und sie enthalten ein physiologisch wirksames, niedermolekulares Molekül, die sogenannte Hämgruppe, welche O_2 zu binden vermag.

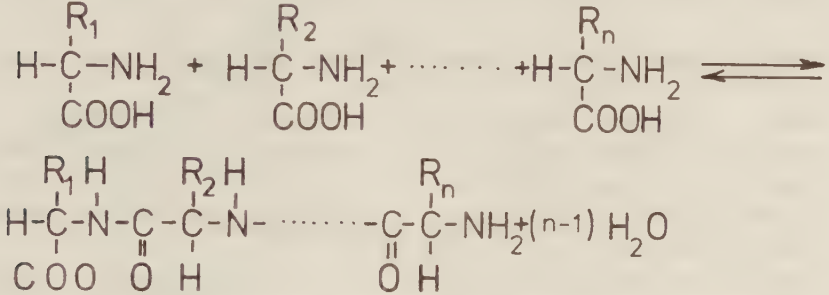
1.1 Primärstruktur der Proteine

Die Bausteine der Proteine sind die Aminosäuren, von denen es in der Natur 20 gibt. Ihre allgemeine chemische Formel lautet:



wobei R durch aliphatische, aromatische Verbindungen oder H^+ ersetzt werden kann.

Bei der Biosynthese der Proteine werden die verschiedenen Aminosäuren nach einem bestimmten Bauplan in einer bestimmten Reihenfolge über ihre Amino- und Carboxyl-Gruppen unter Abspaltung von H_2O zu einem kettenförmigen Molekül (Polypeptid) miteinander verknüpft.



Art, Zahl und Reihenfolge (Sequenz) der Aminosäuren eines Polypeptids verleihen diesen strukturelle (und funktionelle) Eigenschaften, d.h. bestimmen seine räumliche Anordnung.

1.2 Sekundärstruktur der Proteine

Die Peptidkette ist unverzweigbar und besteht im allgemeinen aus vielen Aminosäuren, z.B. bei Sperm-Wal-Myoglobin aus 153. (Kendrew (14)). Die Peptidkette bildet mit den benachbarten

Atomen $-C-\overset{H}{\underset{O}{\parallel}}N-C-$ eine ebene Struktur, während die $-C-C-$ und

$C-N$ -Bindungen frei drehbar sind. Abb. (1a)

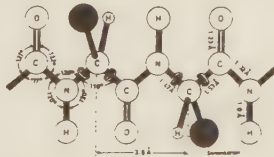


Abb. 1a: Ausgestreckte Peptidkette (Dose(9)).

Dadurch wird es möglich, daß sich das kettenförmige Polypeptid in bestimmte Strukturen auffaltet.

Durch spezifische Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Atomen und Molekülgruppen des Polypeptids wird bei gegebener Sequenz eine bestimmte räumliche Struktur festgelegt.

Eine besonders wichtige Wechselwirkung ist jene zwischen den Amino- , $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ -\text{N}- \end{array}$, und Carboxyl- , $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ -\text{C}- \end{array}$, Gruppen benachbart angeordneter Polypeptide, die zur Bildung von H-Brücken führt. Dadurch wird eine besonders stabile, spiralförmige Anordnung des Polypeptids (Helix) oder eine regelmäßige Faltblattstruktur (sheet) erreicht.

Eine bei globulären Proteinen realisierte spiralförmige Struktur ist die sogenannte α -Helix (nach Pauling und Corey (8)), bei der jede Aminosäure mit der 4. nachfolgenden über eine H-Brücke verknüpft wird. Abb. (1b) zeigt eine α -Helix nach Dose (9). Auf eine Windung der Helix entfallen 3.7 Aminosäurereste mit einer Ganghöhe von 5.4 Å. Die geladenen, hydrophilen, Seitenketten sind nach außen gerichtet und können mit der wäßrigen Umgebung wechselwirken.

Es können in der Sequenz einer Polypeptidkette Aminosäuren vorkommen, die durch ihre Struktur und Seitenketten in die Struktur der α -Helix nicht passen. Dadurch wird die periodische Struktur der α -Helix an solchen Stellen zerstört. An diesen Stellen deformiert sich die α -Helix zu einem knäuelartigen Gebilde (sog. random coil). Die "weiche" (random coil) Struktur der Peptidkette spielt die Rolle eines Scharniers zwischen zwei benachbarten "starren" α -Helices bei der Auffaltung globulärer Proteine.

1.3 Tertiärstruktur der Proteine

Spiralförmig geordnete Teile und nicht geordnete Bereiche (random coil) der Polypeptidkette werden durch weitere Wechselwirkungen untereinander zu einem kompakten globulären Gebilde

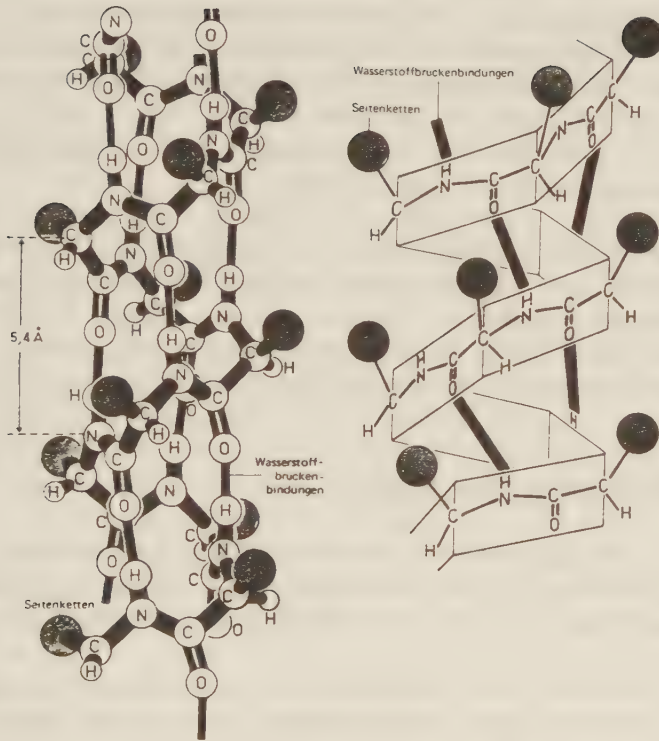


Abb. 1b: Räumlicher Aufbau der α -Helix und die Anordnung der Peptidkette (Dose(9)).

gefaltet (Tertiärstruktur). Zur Bildung der tertiären Struktur eines Proteins können folgende Bindungen beitragen: Die H-Brückenbindungen, die kovalenten Disulfidbindungen zwischen den SH-Gruppen benachbart angeordneter spezieller Aminosäuren, den Cystinen, sowie Salzbrückenbindungen zwischen geladenen Seitenketten von Aminosäuren (COO^- , NH_3^+ , OH^- , ...) und schließlich Van der Waals Wechselwirkungen zwischen ungeladenen Seitengruppen der Aminosäuren.

Bei den wasserlöslichen globulären Proteinen erfolgt die tertiäre Faltung der Polypeptidkette aus energetischen Gründen so, daß polare (hydrophile) Gruppen der Aminosäuren vorwiegend an der Oberfläche, unpolare (hydrophobe) Gruppen der Aminosäuren vorwiegend im Inneren des Proteins liegen.

1.4 Quartärstruktur der Proteine

Bestimmte globuläre Proteine können sich über Salzbrücken, H-Brücken und Van-der-Waals-Bindungen zu Polymeren zusammenlagern. Das Hämoglobin der Wirbeltiere kommt als Tetramer vor.

Die Quartärstruktur des Hämoglobins hat einen großen Einfluß auf seine physiologischen Eigenschaften (Sauerstofftransport). Dies wird später genauer behandelt.

1.5 Prosthetische Gruppe

Enzyme enthalten ein aktives Zentrum, an dem eine bestimmte chemische Reaktion stattfindet. Dieses Zentrum ist entweder eine besondere Molekülgruppe, die in der Proteinstruktur eingebettet ist oder das Zentrum wird durch eine spezielle räumliche Anordnung der Peptidkette innerhalb der Proteinstruktur gebildet.

In Hämproteinen ist die Hämgruppe die physiologisch wirksamste prosthetische Gruppe.

1.6 Struktur und Aufbau des Mb und Hb

Nach der kurzen allgemeinen Einführung in die Proteine wollen wir hier die Struktur der Hämgruppe des Myoglobins und des Hämoglobins näher betrachten.

1.6.1 Struktur der Hämgruppe

Die Hämgruppe besteht aus vier Pyrrolringen, die über vier Methin-Brücken miteinander verknüpft sind. Abb. (2) zeigt diese prosthetische Gruppe nach Weissbluth(10).

Im Zentrum dieser Gruppe befindet sich ein Eisenatom, das sechs Koordinationsstellen besitzt. Vier dieser Koordinationsstellen sind durch die Stickstoffatome der vier Pyrrolringe besetzt. Im folgenden wird die Nomenklatur von Phillips (7) übernommen. Die vier Stickstoffatome in den Ringen I bis IV (Abb. (2)) werden mit den Buchstaben A, B, C, D gekennzeichnet. Die fünfte Koordinationsstelle ist mit dem Stickstoff des proximalen Histidins (F8) kovalent gebunden. Schließlich kann die sechste Stelle verschiedene Liganden wie O_2 , CO, CN, ... binden.

Die Hämgruppe ist an nur einer Stelle (Histidin F8) an das Protein kovalent gebunden. Sie liegt in einer hydrophoben Tasche des aufgefalteten Globins und wird durch Wechselwirkungen ihrer Seitenketten, Methyl-, Äthyl-, Vinyl- und Propionat-Gruppen, mit den Seitenketten des umgebenden Proteins stabilisiert. Trotz der hydrophoben Tasche besitzt die Hämgruppe eine H-Brücke zwischen der Propiongruppe und His FG2 (bei Mb, Takano (5)). Eine andere H-Brücke wird beim Oxy-Hb und Oxy-Mb zwischen dem distalen Histidin E7 und dem gebundenen Sauerstoff gebildet (Schaanan (12), Phillips (7)).

In vivo ist das Eisenatom zweiwertig (Fe^{2+}) und es kann Sauerstoff binden oder abgeben, je nachdem welcher Partialdruck

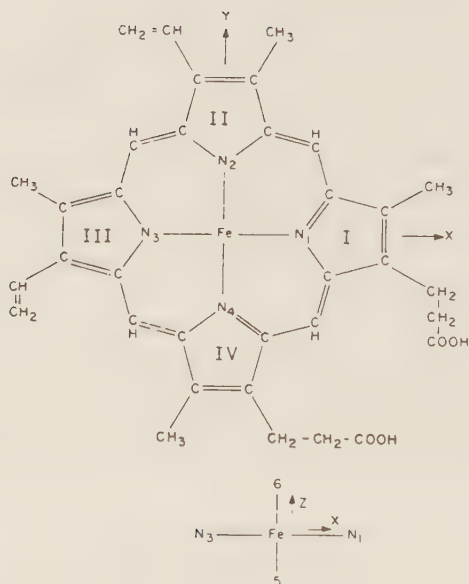


Abb. 2: Die funktionelle Gruppe des Myoglobins (Weissbluth (10)).
 x, y, z kennzeichnen das molekulare Achsensystem.

des Sauerstoffs herrscht. Wenn das Eisenatom zu (Fe^{3+}) oxidiert wird, verliert die Hämgruppe ihre physiologische Funktion und kann keinen Sauerstoff mehr binden, dafür aber kann sie andere Liganden, wie z.B. CN, F, N_3 , in diesem Zustand binden.

1.6.2 Struktur des Myoglobins

Myoglobin ist der rote Muskelfarbstoff. Es dient zur Sauerstoffspeicherung und zum Transport im Muskelgewebe. Es wurde erstmals von Theorell (13) isoliert und kristallisiert. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse wurde seine räumliche Struktur von Kendrew (14, 15) ermittelt.

Mb besteht aus einer Peptidkette von 153 Aminosäuren (bei Sperm Wal Mb Kendrew (14)) mit 8 helikalen Abschnitten (A, B, C, D, E, F, G und H). Abb. (3) zeigt das Myoglobin-Molekül nach Dickerson (16).

Die nicht-helikalen Abschnitte (random coil) sind durch die beiden Buchstaben der jeweiligen benachbarten α -Helices gekennzeichnet. Durch die tertiäre Faltung der Peptidkette entsteht eine hydrophobe Tasche, in der die Hämgruppe sitzt. Der Zugang zur Bindungsstelle der Liganden an das Eisenatom in der Hämgruppe ist sehr eng, so daß nur kleine Moleküle (F, O_2 , CN, CO, ...) zur Hämgruppe gelangen können.

1.6.3 Struktur des Hämoglobins

Die räumliche Struktur des Hämoglobins wurde von Perutz (2) bestimmt. Hb ist ein Tetramer, d.h. es ist aus 4 Untereinheiten aufgebaut. Die Untereinheiten sind paarweise identisch (2 α und 2 β Untereinheiten) und näherungsweise in Tetraedersymmetrie angeordnet. Jede Untereinheit besteht aus einer Peptidkette: die α -Kette enthält 141, die β -Kette 146 Aminosäuren (Perutz (2), (17)); die beiden Sequenzen unterscheiden sich in NA, AB, CD, D, G und GH-Segmenten. (α -Kette unterscheidet sich von Mb in den AB, C, CD, D, E, EF, G, H und HC-Segmenten) (Perutz (2)). Hinsichtlich ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur

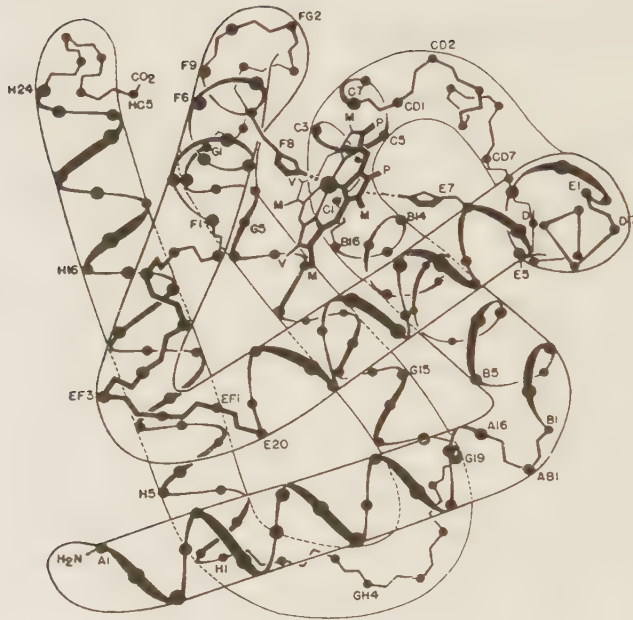


Abb. 3: Raumstruktur des Myoglobins (Dickerson (16))

Die helikalen Bereiche sind durch die Buchstaben A-H, die nicht helikalen durch die beiden Buchstaben der benachbarten Helices, das N-Terminal durch NA und das C-Terminal durch HC bezeichnet.

sind α - und β -Ketten trotzdem einander recht ähnlich und ähneln beide auch dem Myoglobin. Auffällige strukturelle Unterschiede der α - und β -Ketten bestehen in der Häm tasche bzw. in der Art der Einbettung der Hämgruppe in dem Globin. Die Hämgruppe hat in beiden Ketten ca. 60 Kontakte mit dem umgebenden Protein (hauptsächlich mit der E- und F-Helix), davon nur eine polare Bindung zwischen einer der Propionsäuren der Hämgruppe und dem Histidin CD3 (45) in der α -Kette. In der β -Kette gibt es dagegen zwei polare Bindungen. Eine zwischen der Propionsäure der Hämgruppe und dem Serin CD3 (44) und die zweite zwischen der gleichen Propionsäure und dem Lysin E10 (66).

Während der Zugang zur Hämgruppe in der α -Kette offen ist, ist er in der β -Kette durch die nicht reguläre E-Helix und besonders Val 11E, His 7E und Thr 10E fast geschlossen (2), (8).

Zwischen den Untereinheiten α_1 und β_1 bestehen 33 Kontaktstellen, davon sind 4 polar (PhGH5 (117 α) mit Arg B12 (30 β), Asp H9 (126 α) mit Tyr C1 (35 β), Pro GH2 (114 α) mit Arg G18 (116 β) und His G10 (103 α) mit Asn G10 (108 β)) und der Rest unpolar.

Zwischen α_1 -, β_2 -Ketten gibt es 17 Kontakte, zwei davon sind polar und der Rest sind Van der Waals-Kontakte. Die α - α Untereinheiten sind mit 3 Salzbrücken untereinander verknüpft. Die β - β dagegen sind nur durch 2 Salzbrücken verbunden.

Durch die oben erwähnten Kontakte erhält das Hämoglobin seine Tetramerstruktur, die seine physiologische Aufgabe unterstützt.

1.7 Sauerstoffbindung des Myoglobins und des Hämoglobins

Das Myoglobin bindet den molekularen Sauerstoff nach folgender Reaktion:



Nach dem Massenwirkungsgesetz gilt für den Sättigungsgrad y :

$$y = \frac{K \cdot P_{\text{O}_2}}{1 + K \cdot P_{\text{O}_2}} \quad / 1 /$$

$$y = \text{MbO}_2 / (\text{MbO}_2 + \text{Mb})$$

K = Gleichgewichtskonstante

P_{O_2} = Partialdruck des Sauerstoffes

Aus Gleichung / 1 / kann man feststellen, daß die Sauerstoffsättigungskurve des Myoglobins in Abhängigkeit des Partialdruckes des Sauerstoffes hyperbolisch ist.

Abb. (4) zeigt diese Kurve nach Weissbluth (10).

Das Hämoglobin zeigt im Gegensatz zum Myoglobin eine sigmoide Sättigungskurve (Abb. (4)).

Dieser Sättigungsverlauf wird mathematisch durch die Hill-Gleichung:

$$y = \frac{K' \cdot P_{\text{O}_2}^n}{1 + K' \cdot P_{\text{O}_2}^n} \quad / 2 /$$

beschrieben (Antonini (3)). $y = \text{HbO}_2 / (\text{HbO}_2 + \text{Hb})$ und $n = 2.8$.

Dieses Verhalten ist bekannt als kooperativer Effekt der Sauerstoffbindung, der auf den Wechselwirkungen der einzelnen Untereinheiten, der Monomere, beruht.

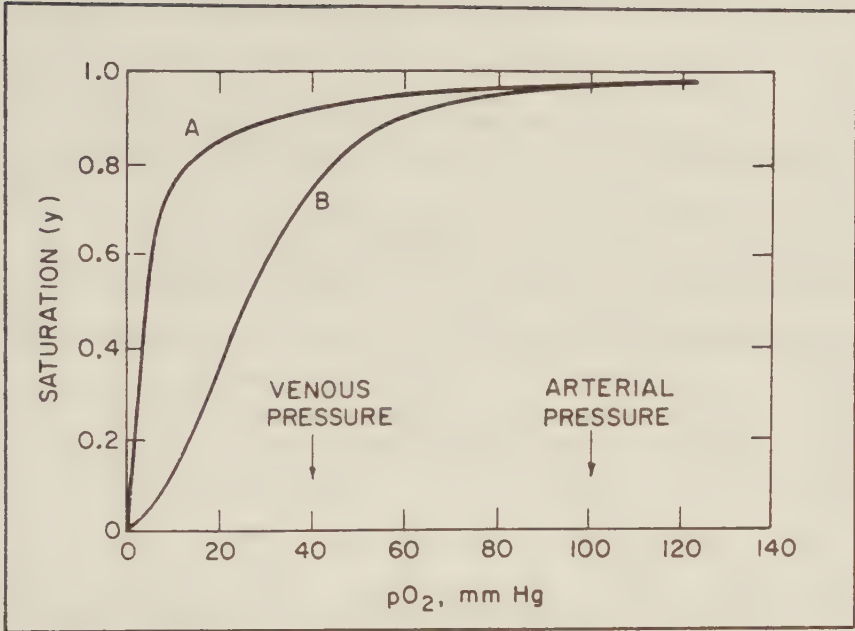


Abb. 4: Sauerstoffsättigungskurven A: Myoglobin, B: Hämoglobin

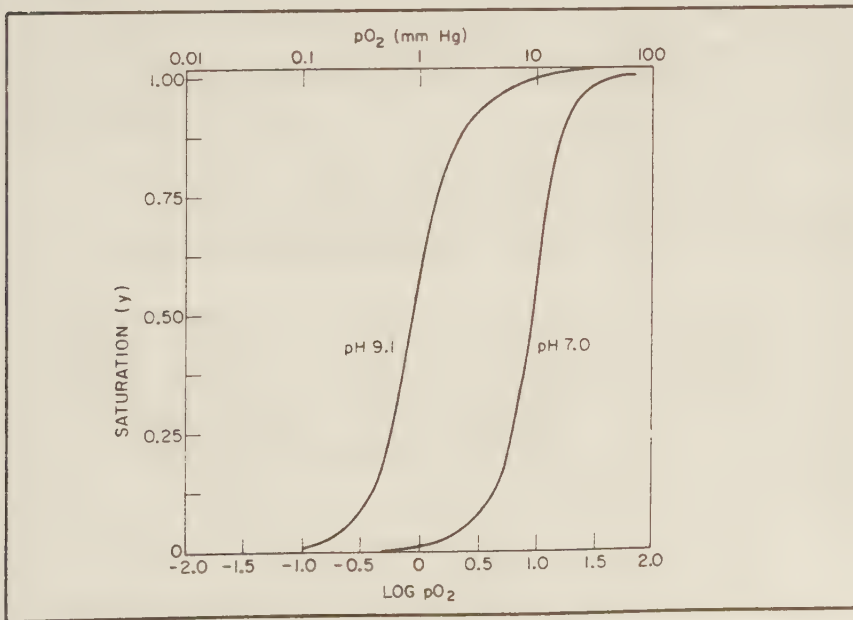


Abb. 5a.: Sauerstoffsättigungskurven für zwei verschiedene pH-Werte des Hämoglobins im alkalischen Bereich (Weissbluth (10))

Wenn eine Untereinheit ein Sauerstoffmolekül bindet, wird die Sauerstoffaffinität der anderen Untereinheiten erhöht.

Wenn wir die Sättigungskurve des Myoglobins mit der des Hämoglobins (Abb. (4) A und B) vergleichen, so stellen wir fest, daß das Myoglobin bei $P_{O_2} = 3.3$ Torr halb gesättigt und das Hämoglobin erst bei $P_{O_2} = 27$ Torr halb gesättigt wird. Diese Tatsache macht die Speicherfunktion des Myoglobins verständlich. Die Sättigungskurve des Hämoglobins hängt vom pH-Wert (sog. Bohr-Effekt) und der Konzentration einiger anorganischer Verbindungen (z.B. 2,3 Diphosphoglycerat) ab Abb. (5a).

Der Bohr-Effekt entsteht durch Abspaltung bzw. Aufnahme von Protonen an den titrierbaren Seitengruppen. Diese wird durch den pH-Wert der Lösung gesteuert. Die Abspaltung von Protonen beeinflusst die Struktur des Moleküls und bewirkt dadurch die Änderung der Sauerstoffaffinität des Moleküls. Umgekehrt führt Anlagerung bzw. Abgabe von Sauerstoff zur Änderung des pK-Wertes der Seitengruppen und beeinflusst damit die Bindung der Protonen (Perutz (18)). Abb. (5b) stellt den Sauerstoff-Bohr-Effekt für das Hämoglobin dar. Hier ist $\log (P_{O_2})_{1/2}$ gegen den pH-Wert der Hb-Lösung aufgetragen. $(P_{O_2})_{1/2}$ ist der Partialdruck des Sauerstoffes für die halbe Sättigung und $\log (P_{O_2})_{1/2}$ ist proportional der Sauerstoffbindungsenergie.

Im Gegensatz zum Hämoglobin ist die Sauerstoffaffinität des Myoglobins fast pH-unabhängig. Es zeigt erst bei 0°C und bei 37°C einen sehr schwachen Bohr-Effekt (La Mar et al. (11)). Abb. (5c) zeigt die pH-Abhängigkeit des Sauerstoffhalbsättigungsdruckes $(P_{O_2})_{1/2}$, für das Sperm-Wal-Myoglobin für verschiedene Temperaturen.

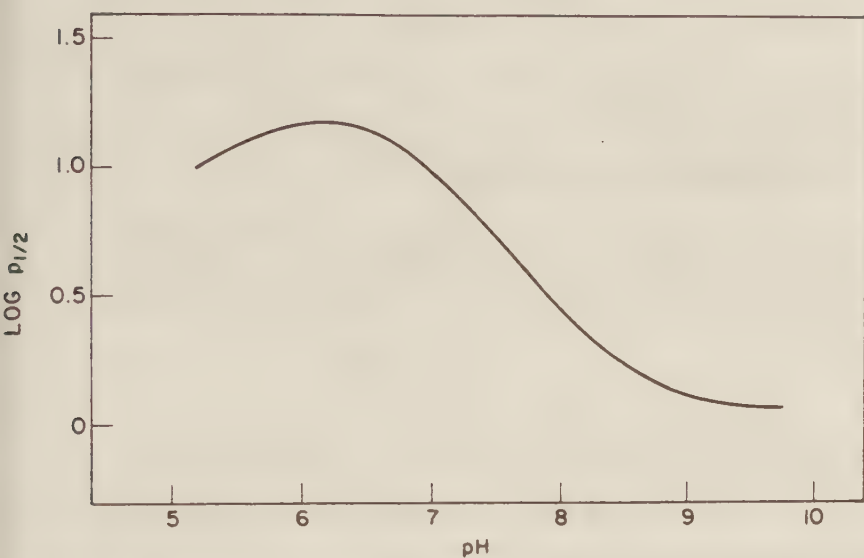


Abb. 5b: Einfluß des pH-Wertes auf die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins (der Bohreffekt) (Weissbluth (10))

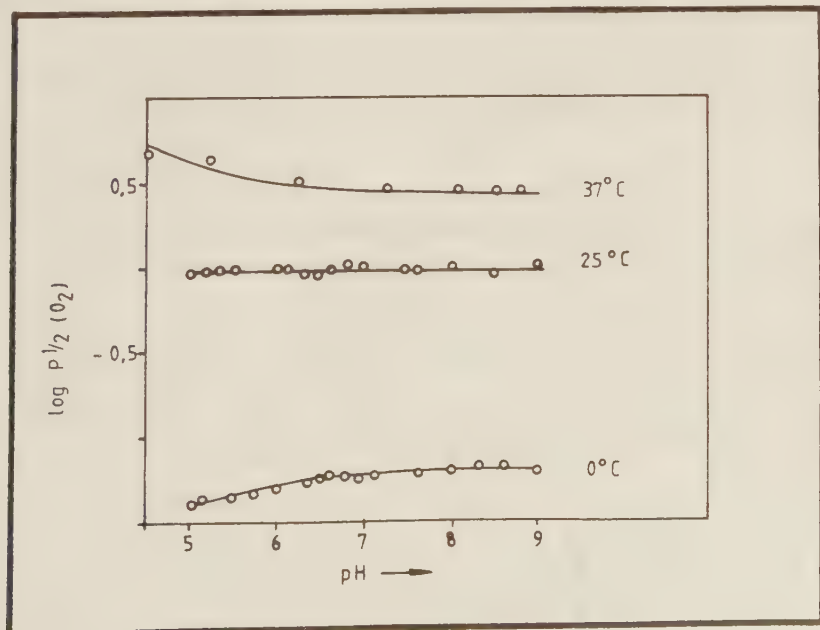


Abb. 5c: Einfluß des pH-Wertes auf die Sauerstoffaffinität des Sperm-Wal-Myoglobins (La Mar et al. (11))

2. Theoretische Einführung

2.1. Einführung in die Ramantheorie

Die Raman-Streuung ist ein unelastischer Streuprozess von elektromagnetischer Strahlung an Materie, bei dem von der eingestrahlten Frequenz ω_0 um $\pm \Delta \omega$ verschobene Frequenzen auftreten.

2.1.1 Klassische Betrachtung des Polarisierbarkeitstensors

Eine auf ein Molekül fallende elektromagnetische Welle mit dem $\vec{E}$ -Vektor $\vec{E}(t) = \vec{E}_0 \cdot \cos \omega t$ induziert in diesem Molekül ein zeitabhängiges Dipolmoment:

$$\vec{P}(t) = \hat{\beta} \cdot \vec{E}(t) \quad / 3 /$$

$\hat{\beta}$ ist der Polarisierbarkeitstensor des Moleküls (Suschtschinskij (19)). Er hängt von den augenblicklichen Abständen q_i (Normalkoordinate) zwischen den Kernen ab. Wir können dann

$$\hat{\beta} = \hat{\beta}(q_i) \quad \text{schreiben.}$$

Nehmen wir an, daß die Kerne eine harmonische Schwingung mit kleiner Auslenkung q_i und der Frequenz ω_i um ihre Gleichgewichtslage $(q_i)_0$ ausführen, so ist

$$q_i(t) = q_{i0} \cos(\omega_i t + \delta_i)$$

Unter diesen Bedingungen können wir $\hat{\beta}(q_i)$ in eine Taylorreihe um die Gleichgewichtslage entwickeln:

$$\hat{\beta}(q_i) = \hat{\beta}_0 + \left(\frac{\partial \hat{\beta}}{\partial q_i} \right)_0 \cdot q_i + \dots \quad / 4 /$$

Aus Gleichungen / 4 / und / 3 / erhalten wir:

$$\begin{aligned} \vec{P}(t) &= \left[\hat{\beta}_0 + \left(\frac{\partial \hat{\beta}}{\partial q_i} \right)_0 \cdot q_{i0} \cdot \cos(\omega_i t + \delta_i) + \dots \right] \cdot \vec{E}_0 \cdot \cos(\omega t) \\ &= \underbrace{\hat{\beta}_0 \cdot \vec{E}_0 \cdot \cos(\omega t)}_A + \underbrace{\frac{1}{2} \left(\frac{\partial \hat{\beta}}{\partial q_i} \right)_0 \cdot \vec{E}_0 \cdot q_{i0} \cdot \cos[(\omega - \omega_i)t + \delta_i]}_B \\ &\quad + \underbrace{\frac{1}{2} \left(\frac{\partial \hat{\beta}}{\partial q_i} \right)_0 \cdot \vec{E}_0 \cdot q_{i0} \cdot \cos[(\omega + \omega_i)t + \delta_i]}_C \quad / 5 / \end{aligned}$$

Das induzierte Dipolmoment in Gleichung / 5 / kann folgende elektromagnetische Strahlungen aussenden:

Term A: Strahlung mit der gleichen Frequenz ω wie die auf das Molekül fallende elektromagnetische Welle.

In diesem Streuprozess tritt keine Frequenzverschiebung auf. Dies wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet.

Term B: Strahlung mit der Frequenz $(\omega - \omega_i)$. Hier tritt eine Verschiebung der Frequenz ω zu niedrigen Frequenzen auf. Dieser Prozess wird als Stokes-Raman-Streuung bezeichnet.

Term C: Strahlung mit der verschobenen Frequenz $(\omega + \omega_i)$. Die Frequenz ω wird hier zu hohen Frequenzen verschoben. Diese Streuung nennt man Anti-Stokes-Raman-Streuung.

Diese Frequenzverschiebungen $(\omega - \omega_i)$ bzw. $(\omega + \omega_i)$ geben Informationen über die Kernschwingungen des streuenden Moleküls.

Aus Gleichung / 5 / ist ersichtlich, daß der Raman-Effekt nur dann stattfinden kann, wenn $\frac{\partial \hat{\beta}}{\partial q_i} \neq 0$ ist, d.h. die Polarisierbarkeit des Moleküls muß sich mit den Kernschwingungen ändern. Mit anderen Worten, es muß eine Kopplung zwischen den Elektronen und den Kernschwingungen des betrachteten Moleküls geben.

Das induzierte Dipolmoment $\vec{P}(t)$ strahlt im Raumwinkelement $d\Omega$ die Intensität dI ab, wobei gilt:

$$dI = \frac{1}{4\pi C^3} \left| \vec{P} \times \vec{n}' \right|^2 d\Omega$$

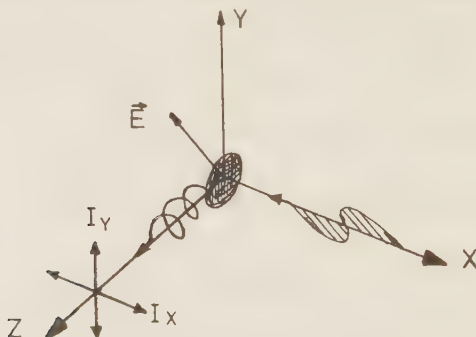
$\vec{P}$ = die 2. Ableitung des Dipolmomentes nach der Zeit
 $\vec{n}'$ = die Beobachtungsrichtung.

Für einen harmonischen Oszillator gilt:

$$dI = 4\pi^3 C \cdot \tilde{\nu}_s^4 \left| \vec{P} \times \vec{n}' \right|^2 d\Omega \quad / 6 /$$

$\tilde{\nu}_s$ = Frequenz der von dem Dipolmoment ausgesendeten Strahlung (Streustrahlung) in Wellenzahlen.

Zur Vereinfachung betrachten wir das streuende Molekül ruhend in dem Koordinatenursprung eines Koordinatensystems X,Y,Z. Die ankommende elektromagnetische Welle möge sich in der (-X)-Richtung fortpflanzen und sei linear polarisiert. Die gestreute Welle wird in Z-Richtung beobachtet.



Unter diesen Bedingungen vereinfacht sich das Produkt in Gleichung / 6 / und man bekommt in diesem Fall für die Intensität folgenden Ausdruck:

$$dI = 4\pi^3 C \cdot \tilde{\nu}_s^4 \cdot (|P_x|^2 + |P_y|^2) \cdot d\Omega$$

$$= dI_x + dI_y \quad / 7 /$$

d.h. die ausgestrahlte Intensität kann in zwei unabhängigen Komponenten $I_x \sim |P_x|^2$ und $I_y \sim |P_y|^2$ gemessen werden. Das Verhältnis der beiden Intensitäten I_x und I_y nennt man Depolarisationsgrad ρ .

$$\rho = \frac{I_y}{I_x}$$

2.1.1.1 Beziehung zwischen den Raman-Intensitäten und den Komponenten des Polarisierbarkeitstensors

Betrachten wir zuerst die Streuung an einem einzigen Molekül, das sich im Ursprung eines raumfesten Koordinatensystems X, Y, Z befindet.

Das molekülfeste Koordinatensystem wird mit x, y, z bezeichnet und sei beliebig im raumfesten Koordinatensystem orientiert. Der Polarisierbarkeitstensor in Gleichung / 3 / kann in Komponenten geschrieben werden. In dem molekularen Koordinatensystem gilt:

$$P_i = \sum_k \beta_{ik} \cdot E_k \quad / 8 /$$

mit i, k = x, y, z.

Weiterhin gilt im Raumkoordinatensystem:

$$P_L = \sum_i n_{iL} \cdot P_i \quad / 9 /$$

$$\text{und} \quad E_k = \sum_M n_{kM} \cdot E_M \quad / 10 /$$

mit L, M = X, Y, Z. n_{iL} , n_{kM} sind die Richtungskosinus zwischen der i-ten- und der L-ten-Achse bzw. der k-ten- und der M-ten-Achse.

Aus den Gleichungen / 3 / , / 10 / und / 9 / erhalten wir:

$$P_L = \sum_i n_{iL} \left[\sum_k \beta_{ik} \left(\sum_M n_{kM} \cdot E_M \right) \right]$$

$$\begin{aligned}
 P_L &= \sum_M E_M \sum_{ik} n_{iL} \cdot n_{kM} \cdot \beta_{ik} \\
 &= \sum_M E_M \cdot \beta_{LM}
 \end{aligned}
 \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} P_L &= \sum_M E_M \sum_{ik} n_{iL} \cdot n_{kM} \cdot \beta_{ik} \\ &= \sum_M E_M \cdot \beta_{LM} \end{aligned}} \right\} / 11 /$$

mit

$$\beta_{LM} = \sum_{ik} n_{iL} \cdot n_{kM} \cdot \beta_{ik} \quad / 12 /$$

Gleichung /12/ stellt die Transformation des Polarisierbarkeitstensors vom Molekülsystem in das Raumsystem dar.

Für die Intensitätsbestimmung muß man das Produkt

$$P_L \cdot P_L^* = |P_L|^2 \text{ bilden.}$$

Aus Gleichung /11/ erhalten wir dann:

$$\begin{aligned}
 P_L \cdot P_L^* &= \sum_M \sum_{M'} \beta_{LM} \cdot \beta_{LM'}^* \cdot E_M \cdot E_{M'} \\
 \text{bzw. aus /12/}
 \end{aligned}
 \quad / 13 /$$

$$P_L \cdot P_L^* = \sum_{ikM} \sum_{i'k'M'} \beta_{ik} \cdot \beta_{i'k'}^* \cdot n_{iL} \cdot n_{kM} \cdot n_{i'L} \cdot n_{k'M'} \cdot E_M \cdot E_{M'} \quad / 14 /$$

Wenn $\vec{E}$ nur eine Komponente besitzt, $\vec{E} = E_M$ längs einer der Achsen X,Y,Z, d.h. die Erregerstrahlung linear polarisiert ist und parallel zur M-ten-Achse des Raumkoordinatensystems fällt, so bekommt man aus Gleichung /13/

$$|P_L|^2 = |\beta_{LM}|^2 \cdot E_M^2 \quad / 15 /$$

Die abgestrahlte Intensität in diesem Fall erhält man aus Gleichung / 7 / und / 15 /

$$I_{ML} = 4 \cdot \pi^3 \cdot C \cdot \tilde{\nu}_s^4 \cdot |\beta_{LM}|^2 \cdot E_M^2 \cdot \delta\Omega$$

oder

$$|\beta_{LM}|^2 = \frac{I_{ML}}{4 \cdot \pi^3 \cdot C \cdot \tilde{\nu}_s^4 \cdot E_M^2 \cdot \delta\Omega} = \frac{A_c \cdot I_{ML}}{I_0 \cdot \tilde{\nu}_s^4} \quad / 16 /$$

Hier sind: I_{ML} die abgestrahlte Intensität in den Raumwinkel $\delta\Omega$. Die Indizes M,L beschreiben die Polarisationsrichtung des einfallenden $\vec{E}$ Vektors (M) und des beobachteten $\vec{E}$ Vektors (L).

I_0 ist die Intensität der anregenden Strahlung, A_c ist eine Konstante. $\tilde{\nu}_s$ ist die Frequenz des gestreuten Lichtes.

In Lösung sind die Moleküle statistisch orientiert. Deshalb ist eine Mittelung über alle Orientierungen der Moleküle notwendig.

Placzek(20) verwendete zur Beschreibung der Streuintensität und des Depolarisationsgrades folgendes Verfahren:

1. Der Polarisierbarkeitstensor $\hat{\beta}$ kann wie jeder beliebige Tensor in 3 Tensoren, isotrop, symmetrisch und antisymmetrisch, zerlegt werden.

$$S_{ij}^0 := \frac{1}{3} (\beta_{xx} + \beta_{yy} + \beta_{zz}) \delta_{ij}$$

$$S_{ij}^s := \frac{1}{2} (\beta_{ij} + \beta_{ji}) - S_{ij}^0 \quad / 17 /$$

$$S_{ij}^a := \frac{1}{2} (\beta_{ij} - \beta_{ji})$$

$\hat{S}^0$ ist der isotrope, $\hat{S}^s$ der anisotrope und $\hat{S}^a$ der antisymmetrische Tensor.

2. Mit Hilfe der Tensorinvarianten (die Spuren = SP)

$SP(\hat{S}^0 \cdot \hat{S}^{0*})$, $SP(\hat{S}^s \cdot \hat{S}^{s*})$ und $SP(\hat{S}^a \cdot \hat{S}^{a*})$ kann man die Intensität nach Berücksichtigung der Mittelungen über alle Orientierungen ausdrücken.

Man verwendet folgende Bezeichnungen:

$$\left. \begin{aligned} \beta^s &= SP(\hat{S}^0 \cdot \hat{S}^{0*}) \\ \gamma^2 &= SP(\hat{S}^s \cdot \hat{S}^{s*}) \\ \beta^a &= SP(\hat{S}^a \cdot \hat{S}^{a*}) \end{aligned} \right\} \quad / 18 /$$

3. Für die spezielle Streugeometrie, in der der $\vec{E}$ -Vektor des Erregerlichtes senkrecht zur Streuebene steht, bekommt man für die Intensitäten und den Depolarisationsgrad folgende Beziehungen:

$$\left. \begin{aligned} I_{||}^{obs} &= \text{Konst.} \cdot I_0 \cdot \tilde{\nu}_s^4 \cdot (10 \beta^s + 4 \gamma^2) \\ I_{\perp}^{obs} &= \text{Konst.} \cdot I_0 \cdot \tilde{\nu}_s^4 \cdot (3 \gamma^2 + 5 \beta^a) \\ \varrho &= \frac{I_{\perp}^{obs}}{I_{||}^{obs}} = \frac{3 \gamma^2 + 5 \beta^a}{10 \beta^s + 4 \gamma^2} \end{aligned} \right\} \quad / 19 /$$

Hier sind $I_{||}^{obs}$ und $I_{\perp}^{obs}$ die gemessenen Intensitäten in einem kleinen Raumwinkel $\delta \Omega$ polarisiert $||$ oder $\perp$ zum $\vec{E}$ -Vektor des Erregerlichtes. I_0 ist die Intensität des Erregerlichtes und $\tilde{\nu}_s$ die Frequenz des gestreuten Raman-Lichtes in cm^{-1} .

Der Depolarisationsgrad ϱ gibt Informationen über die Tensorinvarianten γ^2 , β^s und β^a .

Als Intensitätsprofil (IP) definiert man:

$$I_{||}(\tilde{\nu}_s) = \frac{I_{||}^{obs}(\tilde{\nu}_s)}{I_0 \cdot \tilde{\nu}_s^4} \quad \text{bzw.} \quad I_{\perp}(\tilde{\nu}_s) = \frac{I_{\perp}^{obs}(\tilde{\nu}_s)}{I_0 \cdot \tilde{\nu}_s^4}$$

Die Intensitätsprofile (IPs) stellen eine direkte Beziehung zu den Tensorinvarianten durch Gleichung / 19 / dar.

2.1.2 Quantenmechanische Betrachtung des Polarisierbarkeitsensors

Quantenmechanisch wird die Ramanstreuung durch die allgemeine Schrödingergleichung beschrieben.

$$i \hbar \frac{\partial \Psi(t)}{\partial t} = \hat{H} \cdot \Psi(t)$$

$\hat{H}$ ist der totale Hamilton-Operator des gekoppelten Systems Strahlungsfeld-Molekül und $\Psi(t)$ ist die zeitabhängige Eigenwellenfunktion dieses Systems.

Man kann den Hamilton-Operator $\hat{H}$ wie folgt zerlegen:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_I$$

wobei $\hat{H}_0$ der Hamilton-Operator des entkoppelten Systems ist und $\hat{H}_I$ der Wechselwirkungsoperator des gekoppelten Systems. Weiterhin gilt:

$$\hat{H}_0 = \hat{H}_E + \hat{H}_V + \hat{H}_R$$

$\hat{H}_E$ ist der Hamiltonoperator des ungestörten Elektronensystems des Moleküls, $\hat{H}_V$ der der Kerne und $\hat{H}_R$ der des Strahlungsfeldes.

Der Wechselwirkungsoperator $\hat{H}_I$ hat die allgemeine Form:

$$\hat{H}_I = \hat{H}_{ER} + \hat{H}_{EV} + \hat{H}_{VR}$$

$\hat{H}_{ER}$ ist der Wechselwirkungsoperator zwischen dem Elektronensystem des Moleküls und dem Strahlungsfeld.

$\hat{H}_{EV}$ ist der Wechselwirkungsoperator zwischen dem Elektronensystem und den vibronischen Bewegungen der Kerne.

$\hat{H}_{VR}$ ist der Wechselwirkungsoperator zwischen den Kernen und dem Strahlungsfeld. Dieser Operator führt zur Infrarotabsorption und wird bei der Behandlung des Raman-Effektes vernachlässigt.

Die zeitabhängige Störungsrechnung liefert für die Übergangsrate $\frac{1}{\tau}$ des gekoppelten Systems vom Anfangszustand $|u\rangle$ zum Endzustand $|f\rangle$ n-ter Ordnung nach Loudon (21) folgende Beziehung:

$$\begin{aligned} \frac{1}{\tau} = & \frac{2\pi}{\hbar^2} \sum_f |\langle f | \hat{H}_I | u \rangle|^2 + \frac{1}{\hbar} \sum_l \frac{\langle f | \hat{H}_I | l \rangle \langle l | \hat{H}_I | u \rangle}{\omega_u - \omega_l} \\ & + \dots + \frac{1}{\hbar^{n-1}} \sum_{l_1} \sum_{l_2} \dots \sum_{l_{n-1}} \frac{\langle f | \hat{H}_I | l_1 \rangle \langle l_1 | \hat{H}_I | l_2 \rangle \dots \dots \dots}{(\omega_u - \omega_{l_1}) (\omega_u - \omega_{l_2}) \dots \dots \dots} \\ & \dots \frac{\langle l_{n-1} | \hat{H}_I | u \rangle}{(\omega_u - \omega_{l_{n-1}})} \Big|^2 \cdot \delta(\omega_u - \omega_f) \end{aligned} \quad / 20 /$$

Die Zustände $|l_1\rangle, |l_2\rangle, \dots, |l_{n-1}\rangle$ sind virtuelle Zwischenzustände des Gesamtsystems, $\omega_f, \omega_u, \omega_{l_1}, \dots, \omega_{l_{n-1}}$ sind Energien der betreffenden Zustände.

Innerhalb der obengenannten Gleichung liefern erst Ausdrücke von 3. Ordnung Beiträge zum Raman-Effekt.

Der Wechselwirkungsoperator $\hat{H}_I$ vereinfacht sich in der elektrischen Dipolnäherung zu:

$$\hat{H}_I = \hat{H}_{ER} + \hat{H}_{EV} \quad / 21 /$$

Nach Peticolas et al. (22) gilt:

$$\hat{H}_{ER} = -i \left(\frac{2\pi\hbar}{V} \right)^{\frac{1}{2}} \sum_{K,\delta} \left(2\pi C \cdot \tilde{\nu}_K \right)^{\frac{1}{2}} [a_{\delta,K}^{\dagger} - a_{\delta,K}] \cdot \hat{R}_{\delta,K} \quad /21a/$$

$a_{\delta,K}^{\dagger}$ und $a_{\delta,K}$ sind Erzeugungs- und Vernichtungsoperatoren für Photonen der Frequenz $\tilde{\nu}_K$ und der linearen Polarisation δ . $\hat{R}_{\delta,K}$ ist der Dipoloperator. Er bewirkt einen δ -polarisierten elektrischen Dipolübergang zwischen zwei elektronischen Niveaus des Systems mit der Energie $\hbar \cdot \tilde{\nu}_K \cdot C$.

$$\hat{H}_{EV} = \sum_R \left(\frac{\hbar}{4\pi \cdot C \cdot \tilde{\nu}_R} \right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R} \right) (b_R^{\dagger} + b_R) \quad /21b/$$

$b_R^{\dagger}$, b_R sind Erzeugungs- und Vernichtungsoperatoren eines harmonischen Oszillators mit der Frequenz $\tilde{\nu}_R$. Q_R ist die Normalkoordinate der R-ten Schwingung.

$\frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R}$ bezeichnet man als Elektron-Phonon-Operator.

In der Born-Oppenheimer-Näherung läßt sich die Wellenfunktion Ψ als Produkt der Wellenfunktionen $|n_L\rangle$, $|n_S\rangle$, $|v'\rangle$ und $|e'\rangle$ schreiben.

$|n_L\rangle$: Wellenfunktion des einfallenden Photonenfeldes der Frequenz $\tilde{\nu}_L$

$|n_S\rangle$: Wellenfunktion des gestreuten Photonenfeldes der Frequenz $\tilde{\nu}_S$

$|v'\rangle$: Vibronische Wellenfunktion

$|e'\rangle$: elektronische Wellenfunktion

Unter dieser Annahme ist Ψ hier eine Eigenfunktion des Hamiltonoperators $\hat{H}_0$.

Der Hamiltonoperator des Strahlungsfeldes $\hat{H}_R$ setzt sich aus zwei unabhängigen Operatoren zusammen.

$$\hat{H}_R = \hat{H}_R^L + \hat{H}_R^S$$

$\hat{H}_R^L$: Der Hamiltonoperator des einfallenden Photons der Frequenz $\tilde{\nu}_L$

$\hat{H}_R^S$: Der Hamiltonoperator des gestreuten Photons der Frequenz $\tilde{\nu}_S$

Zur Beschreibung der Zustände im gekoppelten System verwenden wir die Dirac'sche Formulierung. Diese Zustände werden wie folgt bezeichnet:

$ u\rangle = n_L, n_S, v_R, g\rangle$	für den Grundzustand	} / 22 /
$ l_1\rangle = n_L - 1, n_S, v_R, e\rangle$	} für die angeregten Zustände	
$ l_2\rangle = n_L - 1, n_S, v_R \pm 1, e\rangle$		
$ l_3\rangle = n_L - 1, n_S, v_R, s\rangle$		
$ l_4\rangle = n_L - 1, n_S, v_R \pm 1, s\rangle$		
$ f\rangle = n_L - 1, n_S + 1, v_R \pm 1, g\rangle$	für den Endzustand	

$|g\rangle$ ist der elektronische Grundzustand, $|e\rangle$ und $|s\rangle$ sind angeregte elektronische Zustände, n_L und n_S die Besetzungszahlen des einfallenden Photons der Frequenz $\tilde{\nu}_L$ und des gestreuten Photons der Frequenz $\tilde{\nu}_S$, v_R die Besetzungszahl der R-ten Molekülschwingung, wobei $v_R + 1$ für Stokes- bzw. $v_R - 1$ für Antistokes-Streuung gilt.

Aus Gleichungen / 20 / , / 21 / und / 22 / kann man die Übergangsrate $\frac{1}{\tau}$ bestimmen.

Man bekommt dann für die Anti-Stokes-Streuung folgende Übergangsrate:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{16 \cdot \pi^5 \cdot n_L \cdot (n_L + 1)}{V^2 \cdot \hbar^5 \cdot \tilde{\nu}_R} \cdot \tilde{\nu}_L \cdot \sum_{K_S} \tilde{\nu}_S \cdot \left| \sum_{i,k} \sum_{e,s} \right.$$

$$\frac{\langle g | \hat{R}_i | s \rangle \langle s | \frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R} | e \rangle \langle e | \hat{R}_k | g \rangle \langle v_R^s - 1 | Q_R | v_R^e \rangle}{(\epsilon^e - \epsilon^g - \hbar \cdot \tilde{\nu}_L + i\gamma^e) (\epsilon^s - \epsilon^g + \hbar \cdot \tilde{\nu}_R - \hbar \cdot \tilde{\nu}_L + i\gamma^s)} +$$

$$\frac{\langle g | \hat{R}_k | s \rangle \langle s | \frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R} | e \rangle \langle e | \hat{R}_i | g \rangle \langle v_R^s - 1 | Q_R | v_R^e \rangle}{(\epsilon^e - \epsilon^g + \hbar \cdot \tilde{\nu}_L + i\gamma^e) (\epsilon^s - \epsilon^g + \hbar \cdot \tilde{\nu}_L - \hbar \cdot \tilde{\nu}_R + i\gamma^s)} \Big|^2 \quad /23/$$

$$\delta(\tilde{\nu}_L - \tilde{\nu}_S - \tilde{\nu}_R) \hbar c$$

γ^e, γ^s sind zusätzlich eingeführte imaginäre Dämpfungsglieder zur Berücksichtigung der endlichen Lebensdauer der elektronischen Zustände.

Die ausgestrahlte Raman-Intensität ist proportional der Übergangsrate $\frac{1}{\tau}$. Durch die Integration über alle Richtungsvektoren K_S des gestreuten Ramanlichtes bekommt man für die ausgestrahlte Intensität folgende Beziehung:

$$I_{ki} = \frac{16 \cdot \pi^5 \cdot n_L \cdot (n_L + 1)}{V^2 \cdot \hbar^5 \cdot \tilde{\nu}_R} \cdot \tilde{\nu}_L \cdot \tilde{\nu}_S^3 \cdot \left(\sum_k |\beta_{ik} E_k| \right)^2 \quad /24/$$

β_{ik} ist der Polarisierbarkeitstensor in quantenmechanischer Formulierung. Es gilt:

$$\beta_{ik} = \sum_{e,s} \left(\frac{\langle g | \hat{R}_i | s \rangle \langle s | \frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R} | e \rangle \langle e | \hat{R}_k | g \rangle \langle v_R^s - 1 | Q_R | v_R^e \rangle}{(\epsilon^e - \epsilon^g - \hbar \cdot C \cdot \tilde{\nu}_L + i \gamma^e)(\epsilon^s - \epsilon^g + \hbar \cdot C(\tilde{\nu}_R - \tilde{\nu}_L) + i \gamma^s)} \right. \\ \left. + \frac{\langle g | \hat{R}_k | s \rangle \langle s | \frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R} | e \rangle \langle e | \hat{R}_i | g \rangle \langle v_R^s - 1 | Q_R | v_R^e \rangle}{(\epsilon^e - \epsilon^g + \hbar \cdot C \cdot \tilde{\nu}_L + i \gamma^e)(\epsilon^s - \epsilon^g + \hbar \cdot C(\tilde{\nu}_L - \tilde{\nu}_R) + i \gamma^s)} \right)$$

/ 24 a /

Ist $\hbar \cdot C \cdot \tilde{\nu}_L \gg \epsilon^{e,s} - \epsilon^g$ bzw. $\hbar \cdot C \cdot \tilde{\nu}_L \ll \epsilon^{e,s} - \epsilon^g + \hbar \cdot C \cdot \tilde{\nu}_R$ so hängt β_{ik} kaum von der Anregungsfrequenz $\tilde{\nu}_L$ ab. In diesem Falle ist die Intensität proportional $\tilde{\nu}_L \cdot \tilde{\nu}_S^3$. Gilt aber $\hbar \cdot C \cdot \tilde{\nu}_L \approx \epsilon^{e,s} - \epsilon^g$ bzw. $\hbar \cdot C \cdot \tilde{\nu}_L \approx \epsilon^{e,s} - \epsilon^g + \hbar \cdot C \cdot \tilde{\nu}_R$, so wird der komplexe Energienenner des ersten Summanden sehr klein (Resonanzterm), während der zweite Summand sich kaum verändert (Antiresonanzterm). In diesem Fall hängt β_{ik} und somit die Intensität in komplizierter Form von der Anregungsfrequenz ab. Man bezeichnet diesen Sachverhalt als resonanten Raman-Effekt.

Gleichung /24/ entspricht Gleichung/16/, die die Intensität nach klassischer Betrachtung ausdrückt. Die Intensität ist hier proportional (beim nicht resonanten Fall) $\tilde{\nu}_L \cdot \tilde{\nu}_S^3$, in der klassischen Betrachtung dagegen proportional $\tilde{\nu}_S^4$.

Das Matricelement $\langle s | \frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R} | e \rangle$ in Gleichung/23/ beschreibt die Herzberg-Teller-Kopplung wenn $|s\rangle \neq |e\rangle$ ist und die Franck-Condon Übergänge, wenn $|s\rangle = |e\rangle$ ist.

2.2. Bestimmung des Polarisierbarkeitstensors für das Hämolekül

Wenden wir jetzt die allgemeine Formel in Gleichung / 23 / auf das untersuchte System, das Hämolekül, an. Um den Tensor zu bestimmen, müssen wir die elektronischen Übergänge im Hämolekül kennen.

2.2.1 Die elektronischen Übergänge der Hämgruppe

Für die Funktion des Mb und Hb ist die elektronische Struktur des Eisens bedeutungsvoll. Das Fe-Ion kann formal 2- oder 3-wertig auftreten und besitzt daher entweder $3d^6$ oder $3d^5$ Konfiguration

Abhängig von der Lage der Energieniveaus kann die Elektronenkonfiguration verschiedene Spin-Zustände des Fe ergeben:

$$\text{Fe}^{2+} \quad S = 0, 1, 2$$

$$\text{Fe}^{3+} \quad S = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}$$

Hämeisen unterschiedlicher Elektronenkonfiguration besitzt unterschiedliche chemische und physiologische Eigenschaften.

Mb und Hb binden O_2 (oder CO oder NO) nur, wenn Fe zweiwertig ist. Im unligandierten Zustand hat Fe^{2+} den Spin $S = 2$, im ligandierten $S = 0$. Im 3-wertigen Zustand Fe^{3+} vermögen Mb und Hb CN^- , F^- , N_3^- , OH^- und H_2O zu binden.

Je nach Art des Liganden wird der Spin $S = \frac{1}{2}$ (bei OH^- , CN^-) oder $S = \frac{5}{2}$ (bei F^- , H_2O) festgelegt.

Das Fe-Ion sitzt außerhalb der Hämebene und kann seine Position je nach Art des Liganden um einige $1/10 \text{ \AA}$ ändern. Tabelle (1) gibt die Abstände zwischen dem Fe-Ion und der Hauptebene der vier Stickstoffatome des Porphyrinringes (Fe-Ct) für verschiedene Mb- und Hb-Derivate an.

Derivat	MbO ₂	Mb	Mb-Met	Mb-CO	Hb	HbCO	HbO ₂
Fe-Ct (Å)	0.18	0.42	0.4	0.1	α : 0.6 β : 0.63	α : 0.04 β : 0.22	α : 0.13 β : -0.08
Referenz	(7)	(6)	(6)	(6)	(24)	(25)	(12)

Tabelle 1: Abstand zwischen dem Eisenatom und dem Stickstoff N_ε des proximalen Histidins (F8) für verschiedene Mb- und Hb-Derivate.
Fe-Ct: kennzeichnet diesen Abstand.

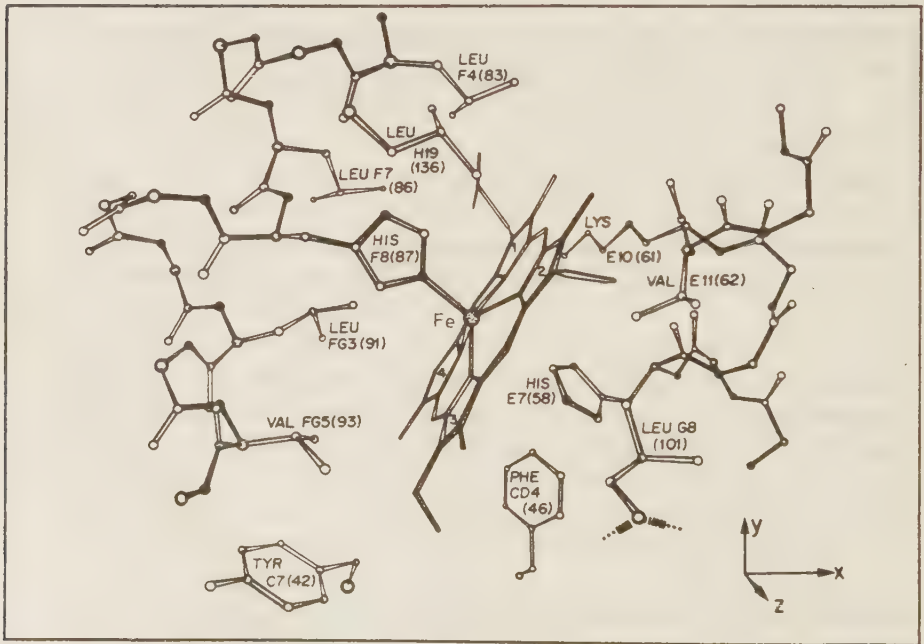


Abb. 6: Lage der Hämgruppe des Hämoglobins (α-Untereinheit) relativ zum Apoprotein (Karplus (78)). Hier sind die wichtigsten Kontakte zwischen dem Protein und der Hämgruppe dargestellt. Die Abbildung zeigt, daß die Hämgruppe (Ringe 1-4) durch die kovalente Bindung Fe-His-F8 gewölbt wird.

Abb. (6) zeigt die Lage des Eisenatoms relativ zur Hämeebene. Hier ist die Wölbung des Hämoleküls deutlich zu sehen, die durch die kovalente Bindung Fe-His-F8 verursacht wird.

Das Hämolekül (Abb. (2)) besitzt eine angenäherte D_{4h} -Symmetrie, wenn man die Seitenketten nicht in Betracht zieht. Die vier Pyrrolringe und das Eisenatom tragen hauptsächlich zu den elektronischen Eigenschaften bei und diese sind durch die D_{4h} -Symmetrie festgelegt.

Abb. (7) zeigt die Absorptionsspektren für Oxy- und Deoxy-Mb im sichtbaren Bereich. Das Hämolekül zeigt in dem Bereich zwischen 400 und 700 nm drei Absorptionsbanden. Eine liegt zwischen 400 und 430 nm und wird als Soret- oder B-Bande bezeichnet. Sie ist um eine Größenordnung stärker als die anderen Banden und wird durch den in x,y polarisierten elektronischen Übergang $(a_{1u}, a_{1u}) \longrightarrow (a_{1u}, e_g)$ (Eaton et al. (23)), (Churg et al. (26)) erzeugt.

Die zweite Absorptionsbande liegt bei 580 nm und wird Q_o - oder α -Bande genannt. Sie wird durch den elektronischen Übergang $(a_{2u}, a_{2u}) \longrightarrow (a_{2u}, e_g)$ verursacht.

Die dritte Bande liegt zwischen der B- und Q_o -Bande und wird mit Q_v bezeichnet. Sie wird durch vibronische Kopplung zwischen der B- und Q_o -Bande erzeugt (Goutermann (27)).

Die drei Absorptionsbanden des Hämoleküls in diesem Bereich ändern ihre Lage (Energie) und ihre Stärke, wenn man den Oxydationszustand des Eisenatoms oder den Liganden ändert. So erscheint z.B. die Q_o -Bande als Schulter bei Deoxy-Mb. Die Q_v -Bande erscheint hier stärker als bei Oxy-Mb. Q_v ist x,y polarisiert, während die Q_o -Bande eine Abweichung von der x,y-Polarisation zeigt (Eaton and Hofrichter (28)).

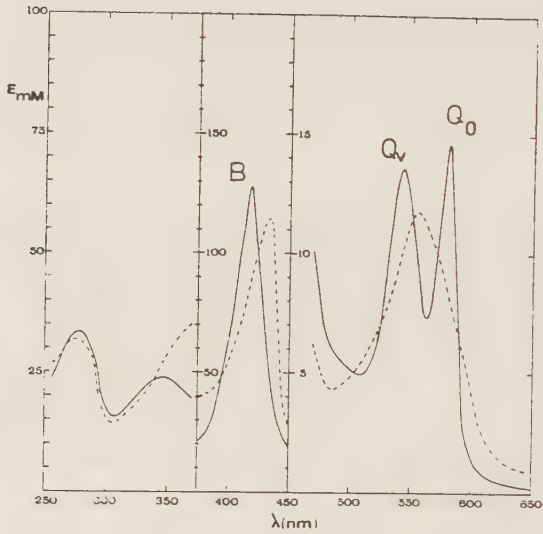


Abb. 7: Absorptionsspektrum des Sperm-Wal Oxy- (—) und Deoxy- (---) Myoglobins nach Antonini (3). Q_o = α -Bande; Q_v = β -Bande und B = Soret-Bande.

Neben den oben genannten Absorptionsbanden treten auch sogenannte Charge-Transfer-Banden auf. Sie sind teilweise z-polarisiert und haben ihre Ursachen in den Überlappungen zwischen den Eisen-3d-Orbitalen und den π -Orbitalen des Porphyrinskeletts (Eaton et al. (29)). Für Deoxy-Mb und Met-Mb-CN gibt es in dem Bereich von 400 nm bis 650 nm keine Charge-Transfer-Übergänge (28). Deshalb werden sie bei der Berechnung des Polarisierbarkeitstensors nicht berücksichtigt.

2.2.2 Berechnung der Komponenten des Polarisierbarkeitstensors für das Hämolekül aus den Lösungsdaten

Im vorherigen Abschnitt lernten wir die elektronischen Übergänge des Hämoleküls kennen. Gleichung /23/ wird dann nur über die elektronischen Übergänge B und Q summiert. Es gilt also $e, S = Q, B$. Die Zustände Q und B transformieren sich in der D_{4h} -Symmetrie wie E_u . Die Symmetrien der erlaubten Ramanschwingungen sind die, für die eine totale symmetrische Darstellung im Produkt $\Gamma_e \times \Gamma_s \times \Gamma_{Q_R}$ aus dem Matrixelement $\langle e | \frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R} | s \rangle$ vorkommt. Der Operator $\frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R}$ transformiert sich wie die Normalkoordinate Q_R der Ramanschwingung Γ_R .

Wegen $\Gamma_{E_u} \times \Gamma_{E_u} = A_{1g} + A_{2g} + B_{1g} + B_{2g}$ sind nur Übergänge erlaubt, die sich wie eine dieser Darstellungen transformieren. Da die Q- und B-Übergänge x,y polarisiert sind, sind alle $\langle e | Z | s \rangle$ gleich Null. Dies läßt alle Tensorkomponenten β_{ik} mit $i = z$ oder $k = z$ gleich Null werden.

Die Depolarisationsgrade (ρ) der verschiedenen Schwingungen lassen sich nach Gleichung /19/ berechnen. Man erhält $\rho = 0.125$ für A_{1g} , $\rho = \infty$ für A_{2g} und $\rho = 0.75$ für B_{1g} und B_{2g} . Daraus folgt, daß der Depolarisationsgrad einer Ramanschwingung Informationen über die Symmetrie dieser Schwingung gibt.

Die bisher angewandte Theorie ergibt keine Abhängigkeit für ρ von der Anregungsfrequenz.

Messungen an Hämssystemen (Collins et al. (31), Schweitzer et al. (32)) zeigen, daß der Depolarisationsgrad ρ sehr stark von der Anregungsfrequenz abhängt. Um diesen Sachverhalt zu deuten, machten Collins et al. (31) den theoretischen Ansatz, in dem sie den Polarisierbarkeitstensor als Linearkombination der vier erlaubten Raman-Schwingungen A_{1g} , A_{2g} , B_{1g} , B_{2g} betrachtete. Der Raman-Tensor ist in diesem Fall gleich:

$$\hat{\beta}(\tilde{\nu}_Q, \tilde{\nu}_B, \tilde{\nu}_L) = \alpha_{Q,B}^{A_{2g}} \cdot \hat{T}^{A_{2g}} \cdot F_{Q,B}^{\tilde{a}}(\tilde{\nu}_Q, \tilde{\nu}_B, \tilde{\nu}_L) +$$

$$\sum_{e,s=Q,B} \left\{ \left(\sum_{\Gamma} \alpha_{e,s}^{\Gamma} \cdot \hat{T}^{\Gamma} \right) \cdot F_{e,s}^{\tilde{s}}(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_L) \right\} \quad / 25 /$$

$F^{\tilde{a}}(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_L)$ und $F^{\tilde{s}}(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_L)$ sind Frequenzfunktionen, die die Energienenner des symmetrischen ($\tilde{s}$) und antisymmetrischen ($\tilde{a}$) Polarisierbarkeitstensors enthalten.

$$F_{e,s}^{\tilde{s},\tilde{a}}(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_L) = \frac{1}{(\tilde{\nu}_e - \tilde{\nu}_L + i\gamma^e) \cdot (\tilde{\nu}_s + \tilde{\nu}_R - \tilde{\nu}_L + i\gamma^s)} + \frac{1}{(\tilde{\nu}_e + \tilde{\nu}_L + i\gamma^e)} \times$$

$$\frac{1}{(\tilde{\nu}_s + \tilde{\nu}_L - \tilde{\nu}_R + i\gamma^s)} \pm \frac{1}{(\tilde{\nu}_e + \tilde{\nu}_R - \tilde{\nu}_L + i\gamma^e)(\tilde{\nu}_s - \tilde{\nu}_L + i\gamma^s)} \pm$$

$$\frac{1}{(\tilde{\nu}_e + \tilde{\nu}_L - \tilde{\nu}_R + i\gamma^e)(\tilde{\nu}_s + \tilde{\nu}_L + i\gamma^s)} \quad / 26 /$$

Das Vorzeichen (+) gilt für die symmetrische $F^{\tilde{s}}$ -Funktion und (-) für die antisymmetrische $F^{\tilde{a}}$ -Funktion.

$e, s = Q, B$ sind Frequenzindizes für die elektronischen Übergänge Q (α -Bande) und B (Soret-Bande).

$\tilde{\nu}_L$ bezeichnet die Laser-Frequenz (die Anregungsfrequenz)
 γ^e, γ^s bezeichnen die Halbwertsbreiten der elektronischen Übergänge

$\alpha_{e,s}^{\Gamma}$ sind komplexe Konstanten. Sie repräsentieren die Stärke jeder Darstellung Γ in einer Raman-Schwingung $\tilde{\nu}_R$.

$\hat{T}^{\Gamma}$ sind Tensoren der in der D_{4h} -Symmetrie erlaubten Darstellungen Γ . Sie wurden von McClain (33) nach gruppentheoretischen Überlegungen bestimmt. Sie sind:

$$\hat{T}^{A_{1g}} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \quad \hat{T}^{A_{2g}} = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix},$$

$$\hat{T}^{B_{1g}} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \quad \hat{T}^{B_{2g}} = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}. \quad /27/$$

Mit diesem Ansatz konnten Collins et al. (31) die Abhängigkeit des Depolarisationsgrades von der Anregungsfrequenz für Cytochrom-C simulieren, indem sie die Konstanten $\alpha_{e,s}^{\Gamma}$ durch einen Computerfit für die ρ (Gleichung /19/) berechnen ließen.

Dieser Ansatz wurde dann von Schweitzer et al. (34) physikalisch interpretiert und ergänzt. Zur Interpretation von Gleichung /26/ machten sie folgende Annahme: Das Hämolekül sei aus der D_{4h} -Symmetrie verzerrt. Diese Verzerrung $\delta \vec{Q}$ läßt sich als Linearkombination der Verzerrungen $\delta \vec{Q}_k$ der einzelnen Normalkoordinaten schreiben:

$$\delta \vec{Q} = \sum_k^n \delta \vec{Q}_k$$

Der Elektron-Phonon-Operator $\frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R}$ wird um die Gleichgewichtslage $\delta \vec{Q}_0 = 0$ entwickelt. Man erhält:

$$\left(\frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R} \right)_{\text{verz.}} = \left. \frac{\partial \hat{H}(Q)}{\partial Q_R} \right|_{\delta Q_0} + \sum_k^n \frac{\partial^2 \hat{H}(Q)}{\partial Q_R \cdot \partial Q_k} (\delta Q_k) \quad /28/$$

Setzt man jetzt Gleichung /28/ in Gleichung /24a/ ein, so bekommt man folgende Beziehung:

$$\begin{aligned}
 (\beta_{ik})_{\text{verz.}} = & \beta_{ik} + \sum_k^n \sum_{e,s} \left\{ \frac{\langle g | \hat{R}_i | s \rangle \langle s | \frac{\partial^2 \hat{H}(Q)}{\partial Q_R \partial Q_k} | e \rangle \langle e | \hat{R}_k | g \rangle}{(\mathcal{E}^e - \mathcal{E}^g + \hbar c \cdot \tilde{\nu}_L + i \gamma^e)(\mathcal{E}^s - \mathcal{E}^g + \hbar c(\tilde{\nu}_R - \tilde{\nu}_L) + i \gamma^s)} \right. \\
 & + \frac{\langle g | \hat{R}_k | s \rangle \langle s | \frac{\partial^2 \hat{H}(Q)}{\partial Q_R \partial Q_k} | e \rangle \langle e | \hat{R}_i | g \rangle}{(\mathcal{E}^e - \mathcal{E}^g + \hbar c \tilde{\nu}_L + i \gamma^e)(\mathcal{E}^s - \mathcal{E}^g + \hbar c(\tilde{\nu}_L - \tilde{\nu}_R) + i \gamma^s)} \left. \right\} \times \\
 & \langle \nu_R^s - 1 | Q_R | \nu_R^e \rangle \delta Q_k \quad /29/
 \end{aligned}$$

β_{ik} ist der Polarisierbarkeitstensor für das in D_{4h} -Symmetrie ungestörte Molekül. Durch die Verzerrungen kommen zusätzliche Terme hinzu. Durch das Summieren über alle (k) treten in der Doppelsumme die Linearkombinationen der erlaubten Raman-Schwingungen auf. Da $|e\rangle$ und $|s\rangle$ wie E_u in der D_{4h} -Symmetrie sich transformieren und der Operator

$\frac{\partial^2 \hat{H}(Q)}{\partial Q_R \partial Q_k}$ sich wie das Produkt $\Gamma_{Q_R} \times \Gamma_{Q_k}$ (Γ_{Q_R} und Γ_{Q_k} sind die Darstellungen der R-ten und k-ten Normalkoordinate in der D_{4h} -Symmetrie) transformiert, muß sich jede Produktdarstellung dieser Zustände wie A_{1g} , A_{2g} , B_{1g} oder B_{2g} transformieren. Daraus kann man bei vorgegebener Darstellung der Raman-Schwingung berechnen, welche Verzerrungsrasse welchen zusätzlichen Ramantensor in die Linearkombination einbringt. Eine Korrelationstabelle ist bei Schweitzer (35) gegeben. Gleichung /29/ ist dem Ansatz von Collins in Gleichung /25/ äquivalent.

Damit ist dieser Ansatz physikalisch interpretiert. Die Konstanten $\alpha_{e,s}^\Gamma$ sind lineare Funktionen der Verzerrungen $\delta \vec{Q}_k$. Sie geben damit Information über die Symmetrieänderung des Moleküls.

Schweitzer et al. (34) ergänzten diesen Ansatz, indem sie die vibronische β -Bande berücksichtigten. Dies führte mit Berücksichtigung der $0 \rightarrow 1$ Übergänge in der Q- und B-Bande zu der endgültigen Formel des Polarisierbarkeitstensors.

Sie lautet:

$$\hat{\beta}(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_L, \tilde{\nu}_\mu) = \sum_{\mu} \{ \alpha_{Q,B}^{A2g} \cdot \hat{T}^{A2g} [F_{QB}^{\tilde{0}}(\tilde{\nu}_Q, \tilde{\nu}_B, \tilde{\nu}_L) + \tilde{C}_{QB}^{\mu} \cdot F_{QB}^{\tilde{d}}(\tilde{\nu}_Q + \tilde{\nu}_{\mu}, \tilde{\nu}_{\mu}, \tilde{\nu}_B, \tilde{\nu}_L)] + \sum_{e,s} [(\sum_{\Gamma} \alpha_{e,s}^{\Gamma} \cdot \hat{T}^{\Gamma}) \times (F_{e,s}^{\tilde{s}}(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_L) + C_{e,s}^{\mu} \cdot F_{e,s}^{\tilde{s}}(\tilde{\nu}_e + \tilde{\nu}_{\mu}, \tilde{\nu}_s + \tilde{\nu}_{\mu}, \tilde{\nu}_L))] \}$$

/ 30 /

$\tilde{\nu}_{\mu}$ ist die repräsentative Phononfrequenz, die zur vibronischen Seitenbande β im Q- und B-Übergang führt. Zur Vereinfachung wird hier nur ein Phonon betrachtet. $C_{e,s}$, $\tilde{C}_{Q,B}$ sind reelle Konstanten und werden als die Franck-Condon-Überlappungsintegrale bezeichnet. Die anderen Konstanten sind in den Gleichungen / 25 / und / 26 / beschrieben.

Gleichung / 30 / stellt einen wichtigen und physikalisch sehr interessanten Ansatz zur Beschreibung des Polarisierbarkeitstensors dar, womit man die Verzerrungen des Moleküls durch die Konstanten $\alpha_{e,s}^{\Gamma}$ ermitteln kann. Dieser Ansatz eröffnet ein neues Gebiet der Strukturuntersuchungen dieses komplizierten Moleküls.

Ausgehend von der Dispersionskurve des Depolarisationsgrades und den Intensitätsprofilen, kann man mit Hilfe eines Computerfits die Konstanten $\alpha_{e,s}^{\Gamma}$ bestimmen. Damit können folgende Informationen über das Molekül erhalten werden:

1. Der gesamte Polarisierbarkeitstensor und seine Frequenzabhängigkeit können bestimmt werden. Bis jetzt war für Moleküle in Lösungen nur die Bestimmung der drei Tensorinvarianten β^s , γ^2 und β^a möglich.
2. Man kann den Polarisierbarkeitstensor für unzugängliche Meßbereiche, die von der technischen Seite her nicht realisierbar sind (z.B. Laser für Anregung in diesen Meßbereichen), vorhersagen. (Dies gilt nur in den Frequenzbereichen, in denen keine anderen elektronischen Übergänge außer Q, B zum Raman-Tensor beitragen.)
3. Die Verzerrungen jeder Raman-Schwingung können durch $\alpha_{e,s}^r$ bestimmt werden. Da diese aber linear von der Verzerrung $\vec{\delta Q}_k$ der Normalkoordinate abhängen, kann man die Verzerrungen des Moleküls selbst bestimmen. Diese Tatsache ist physikalisch sehr interessant, da sie die Wechselwirkungen zwischen dem Hämolekül und seiner Umgebung quantitativ zu beschreiben ermöglicht. Schweitzer (35) und Schweitzer et al. (34) verwandten diese Methode zur Erklärung der pH-Abhängigkeit des Depolarisationsgrades für das Deoxy-Hb. Sie stellten fest, daß die Fitkonstanten $\alpha_{e,s}^r$ sich mit Änderung des pH-Wertes der Lösung ändern. Dies zeigt, daß alle Verzerrungen der Hämgruppe im gleichen Maß von den pH-induzierten Veränderungen betroffen sind. Diese Korrelation weist die Konsistenz dieser Methode auf.

Um diese Methode praktisch durchführen zu können, brauchen wir drei unabhängige Sätze von Meßdaten, nämlich $\rho(\tilde{\nu})$, $I_{||}(\tilde{\nu}_L)$ und $I_{\perp}(\tilde{\nu}_L)$. In dem Fitverfahren ist man aber auf eine große Zahl von Fitparametern (≈ 20) angewiesen. Um diesen Unsicherheitsfaktor so gering wie möglich zu halten, stellen wir hier an diese Methode andere Randbedingungen.

Wenn die beschriebene Methode richtig ist, so kann man alle Komponenten des Raman-Tensors des Hämoleküls in dem Frequenzbereich zwischen der Q- und B-Bande aus dem Fitverfahren bekommen. Alle Ergebnisse verschiedener Raman-Experimente an diesem Hämolekül in dem erwähnten Frequenzbereich sind dann

vorhersagbar. Wir haben deshalb resonante Raman-Messungen an Lösungen und Kristallen beider Myoglobinkomplexe, Myoglobin-Met-Cyanid (Met-Mb-CN) und Deoxy-Myoglobin (Deoxy-Mb) durchgeführt.

Aus den Lösungen bestimmten wir die Depolarisationsgrade $\rho(\tilde{\nu}_L)$ und die beiden Intensitätsprofile $I_{||}(\tilde{\nu}_L)$ und $I_{\perp}(\tilde{\nu}_L)$

Die Kristallmessungen an der axb-Fläche liefern vier Intensitätsprofile, die sich aus den möglichen Orientierungen der Polarisation des Erregerlichtes und des gestreuten Lichtes längs der b- bzw. a-Kristallachse ergeben.

Durch das Fitten von $\rho(\tilde{\nu}_L)$, $I_{||}(\tilde{\nu}_L)$ und $I_{\perp}(\tilde{\nu}_L)$ aus den Daten der Lösung erhielten wir den Raman-Tensor, der zur Berechnung der vier Intensitätsprofile des Kristalls verwandt wurde.

In diesem Verfahren sollen sieben unabhängige Sätze von Meßdaten mit einem einzigen Satz von Parametern, der aus den Lösungsmeßdaten berechnet wird, beschrieben werden.

Die wichtigsten Voraussetzungen für dieses Verfahren sind:

1. Die Eigenschaften des untersuchten Moleküls in Lösung sollen vom pH-Wert dieser Lösung unbeeinflussbar sein, da der pH-Wert im Kristall nicht definierbar ist.
2. Das Hämmolekül muß bezüglich der Ramanstreuung in der Lösung und im Kristall gleich sein, d.h. die Kristallisation soll die Struktur des Moleküls nicht ändern.

Das Myoglobin in Lösung und im Kristall erfüllt die oben gestellten Forderungen.

Unsere Raman-Messungen zeigen, daß die Raman-Linien 1355 cm^{-1} und 1564 cm^{-1} in Deoxy-Mb und die entsprechenden Raman-Linien im Met-Mb-CN weder in $\rho(\tilde{\nu}_L)$ noch in den Intensitätsprofilen innerhalb des Meßfehlers eine pH-Abhängigkeit aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigt HbO_2 eine große pH-Abhängigkeit (Schweitzer et al. (32)).

Da das Häm-molekül in einer hydrophoben Tasche innerhalb des Mb-Moleküls sitzt und damit von der äußeren Umgebung fast abgeschirmt ist, kommt es durch die Kristallisation zu keinen direkten Wechselwirkungen zwischen den Häm-molekülen in der Kristallphase. Dies entspricht dem Modell der orientierten Gasphase (Eaton et al. (23)). Deshalb haben wir angenommen, daß das Häm-molekül im Kristall identisch mit dem in der Lösung ist. Diese Annahme wurde durch die gute Übereinstimmung zwischen den theoretischen und den experimentellen Intensitätsprofilen des Kristalls bestätigt.

Zunächst müssen wir uns mit den Messungen an Mb-Kristallen vertraut machen.

2.2.3 Beziehung zwischen den gemessenen Intensitätsprofilen von Mb-Kristallen und den Komponenten des Raman-Tensors im Molekülsystem

Im Abschnitt 2.1.1 wurde die Raman-Streuung an einem einzigen Molekül behandelt, das fest im Koordinatensprung des Raumsystems gedacht wurde. In diesem Abschnitt soll die Raman-Streuung an einem Netz orientierter Myoglobinmoleküle, Mb-Kristallnetzebenen, behandelt werden.

a) Myoglobinkristall

Sperm-Wal-Myoglobin läßt sich leicht in konzentrierter, 2-3 mol., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung bei Zimmertemperatur oder bei 4°C kristallisieren (Kendrew(4), Takano(5)). Die so erhaltenen Mb-Kristalle besitzen eine monokline Form und können durch die Raumgruppe P_{21} beschrieben werden.

Mb-Kristalle können in zwei verschiedenen Trachten je nach pH-Wert der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wachsen.

Wenn der pH-Wert kleiner als 7.0 ist, wachsen die Kristalle mit ausgeprägter (axb)-Fläche. Abb. (8;A).

Sind die pH-Werte größer als 7.0, wachsen sie mit ausgeprägter (bxc)-Fläche. Abb.(8; B).

Die Einheitszelle wird durch die Basisvektoren ($\vec{a}$, $\vec{b}$, $\vec{c}$) und die Winkel $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 105,78^\circ$ vollständig beschrieben.

α = der Winkel zwischen a und b

γ = der Winkel zwischen b und c

β = der Winkel zwischen c und a.

Sie besitzt folgende Dimensionen:

$a = 64.6 \text{ \AA}$, $b = 31,1 \text{ \AA}$, $c = 34.8 \text{ \AA}$ (Kendrew (4), Phillips (6), Takano (5)).

Zur Vereinfachung verwendet man orthogonale Basisvektoren, die sich aus den oben erwähnten Vektoren durch Drehung gewinnen lassen.

Hier werden zwei Koordinatensysteme definiert:

1. Das orthogonale Koordinatensystem $\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*$; $\vec{c}^* \perp \vec{a} \times \vec{b}$, wird zur Beschreibung des Mb-Kristalls mit der ausgeprägten (axb) Fläche verwendet.
2. Das orthogonale Koordinatensystem $\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*$; $\vec{a}^* \perp \vec{b} \times \vec{c}$, beschreibt den Mb-Kristall mit der ausgeprägten (bxc) Fläche.

Der Winkel zwischen den Vektoren $\vec{c}$, $\vec{c}^*$ bzw. $\vec{a}$, $\vec{a}^*$ beträgt 15.78° .

In der Einheitszelle befinden sich zwei Myoglobinmoleküle. Dies entspricht einer Myoglobinkonzentration von 0.049 Mol/l. (Eaton (23)).

Die Orientierung der beiden Hämoleküle in der Einheitszelle wurde in Bezug auf die Kristallachsen durch Röntgenanalyse (Kendrew (4) und Takano (5)), Elektronenspinresonanz (Bennet et al. (36)), polarisierte optische Absorption (Eaton et al. (23)) und in dieser Arbeit bestimmt. Die beiden Hämoleküle können durch eine zweizählige Schraubenachse, die b-Achse, ineinander überführt werden (Abb. (8; C).

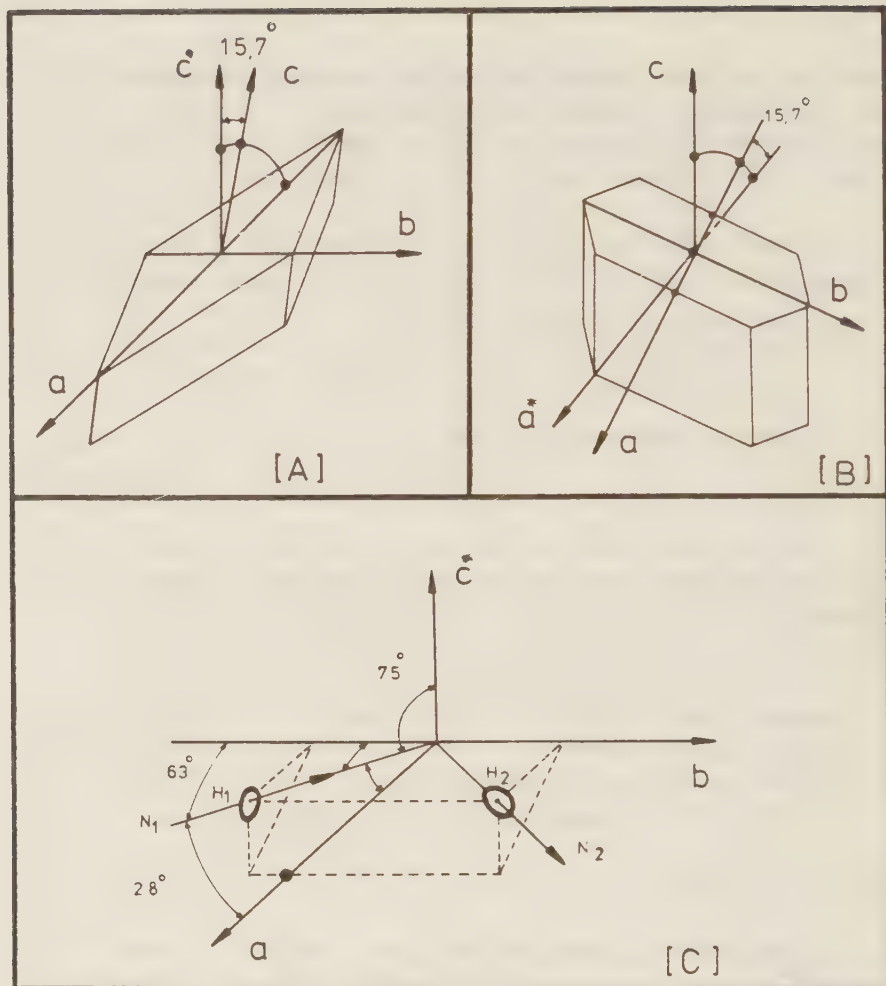


Abb. 8 : Sperm-Wal -Myoglobinkristall Typ A, Raumgruppe $P_{2,1}$ nach Kendrew und Parrish (4) ; Bennet et al. (36).

A : Kristall mit ausgeprägter (axb)-Fläche. Die Kristallachsen a, b, c^* sind orthogonal. Die c^* -Achse bildet einen Winkel von 15.78° mit der c -Achse und liegt mit den c - a -Achsen auf einer Ebene.

B : Kristall mit ausgeprägter (cxb)-Fläche. Hier sind die Kristallachsen a^*, b, c orthogonal. Der Winkel zwischen a - und a^* -Achse beträgt ebenfalls 15.78° . Die Achsen a^*, a, c liegen auf einer Ebene.

C : Lage der Hämgruppen im Bezug auf die Kristallachsen a, b, c^* . H_1 bzw. H_2 bezeichnet die 1. bzw. 2. Hämgruppe in der Einheitszelle. N_1 und N_2 bezeichnen die zugehörigen Hämnormale. Die Winkel der 1. Hämnormale mit den Kristallachsen sind hier angegeben. Die beiden Hämnormale unterscheiden sich durch eine Drehung um 180° um die b -Achse. Ihre Richtungskosinus sind im Betrag gleich.

Die Raman-Messungen wurden wegen der Kristallabmessungen (siehe II § 1.2.1) nur an Kristallen mit ausgeprägter (axb)-Fläche durchgeführt, während die optischen Absorptionsmessungen an beiden Kristalltrachten durchgeführt wurden.

b) Transformation der Tensorkomponenten vom Molekülsystem ins Raumsystem und ihre Beziehung zur gemessenen Intensität des Kristalls

Die Raman-Messungen an der (axb) Fläche des Mb-Kristalls wurden mit den folgenden möglichen Kombinationen durchgeführt:

Der $\vec{E}$ -Vektor des anregenden Laserlichtes wurde parallel zur a- oder b-Achse eingestellt und das gestreute Raman-Licht wurde dann für jede Stellung des $\vec{E}$ -Vektors parallel zur a- bzw. zur b-Achse analysiert.

Unter Verwendung der Nomenklatur von Damen et al. (37) erhalten wir für diese spezielle Streugeometrie (180° -Rückstreuung) folgende Meßmöglichkeiten:

$$\bar{Z} (X,X) Z, \bar{Z} (X,Y) Z, \bar{Z} (Y,X) Z \text{ und } \bar{Z} (Y,Y) Z$$

Die Buchstaben außerhalb der Klammern bezeichnen die Einfallsrichtung des Erregerstrahls (links) und die Beobachtungsrichtung des gestreuten Lichtes (rechts). Das (-) Zeichen oben links bedeutet, daß der einfallende Erregerstrahl längs der (-Z)-Achse fällt.

Die Buchstaben innerhalb der Klammern indizieren die Polarisationsrichtung des Erregerstrahls (links) und die des gestreuten (rechts).

Das verwendete Kristallachsensystem ist hier a, b, c* und wird im Raumsystem wie folgt bezeichnet:

$$a \hat{=} X, b \hat{=} Y \text{ und } c^* \hat{=} Z$$

Um den Raman-Tensor vom Molekülsystem ins Raumsystem transformieren zu können, verwendet man Gleichung /12/.

Man benötigt dafür aber die Richtungskosinus n_{iL} , n_{kM} zwischen den Achsen des Molekül- und Raumkoordinatensystems. Man muß deshalb das Molekülkoordinatensystem definieren. Dies bezeichnen wir mit den Achsen x , y und z und es wird in einem späteren Abschnitt genauer beschrieben.

Die Einheitszelle des Mb-Kristalls besitzt zwei Myoglobin-Moleküle. Wir müssen deshalb die Streuung an zwei verschiedenen orientierten Hämolekülen (bzw. zwei Reihen davon) berücksichtigen. Wir bezeichnen sie mit (1) und (2).

Da der Raman-Tensor im Hämolekül $\hat{\beta}$ nur vier Komponenten besitzt (siehe 2.2.2), nämlich $(\beta_{xx}, \beta_{xy}, \beta_{yx}, \beta_{yy})$, kann man Gleichung / 12 / jetzt wie folgt umschreiben:

$$\hat{\beta}' = \hat{A} \cdot \hat{\beta} \quad / 30 a /$$

$\hat{A}$ ist eine Matrix, die die Produkte der Richtungskosinus $n_{ik} \cdot n_{kM}$ enthält.

In unserer speziellen Streugeometrie an diesem Kristall bekommt man die folgenden vier Intensitäten:

I_{XX} , I_{XY} , I_{YX} und I_{YY} , wobei der erste Index die Polarisationsrichtung des Erregerstrahles und der zweite die des gestreuten darstellt. Der Laserstrahl und der gestreute Strahl fallen hier parallel zur Z -Achse.

Diese Intensitäten werden durch die inkohärente Streuung beider Hämoleküle (bzw. Hämreihen) (1) und (2) im Kristall erzeugt. Aus Gleichung / 16 / bekommen wir dann:

$$I_{ML} = 4 \cdot \pi^3 \cdot C \cdot \tilde{\nu}_s \cdot [|\beta_{LM}^{(1)}|^2 + |\beta_{LM}^{(2)}|^2] \cdot \frac{N}{2} \cdot E_M^2 \cdot (\delta \Omega) \quad / 31 /$$

$M, L = X, Y$; N ist die Anzahl der an dem Streuprozess beteiligten Moleküle und $\delta \Omega$ ist ein fester Raumwinkel.

Da die Symmetrieachse des Kristalls die b-Achse ist, stehen die Richtungskosinus des Hämoleküls $n_{ik}^{(1)}$ und $n_{ik}^{(2)}$ in folgender Beziehung (siehe Anhang I) zueinander:

$$n_{iL}^{(1)} = - n_{iL}^{(2)} \quad \text{für } L = X, Z$$

$$\text{und } n_{iL}^{(1)} = + n_{iL}^{(2)} \quad \text{für } L = Y$$

Setzen wir diese Beziehungen in Gleichung /30c/ein, so erhalten wir:

$$|\beta_{LM}^{(1)}|^2 = |\beta_{LM}^{(2)}|^2 = |\beta_{LM}|^2$$

Diese Beziehung wird dann in Gleichung /31/ eingesetzt und wir erhalten:

$$|\beta_{LM}|^2 = \frac{I_{ML}}{4 \cdot \pi^3 \cdot C \cdot N \cdot (\delta\Omega) \cdot E_M^2 \cdot \tilde{\nu}_s^4} = \frac{A_C \cdot I_{ML}}{I_0 \cdot \tilde{\nu}_s^4} \quad / 32 /$$

Gleichung /32/ gibt die Intensitätsprofile für den Mb-Kristall an.

Mit Gleichung /30c/und /31/sind die Beziehungen zwischen den Intensitätsprofilen des Kristalls und den Raman-Tensorkomponenten im Molekülsystem festgelegt.

2.2.4 Berücksichtigung der optischen Absorption

Bisher haben wir angenommen, daß die Mb-Lösungen und Kristalle optisch transparent sind. Da sie in dem betrachteten Bereich des optischen Spektrums absorbieren (siehe optische Spektren), müssen die Intensitäten für Mb-Lösungen und Kristalle korrigiert werden.

Nach Loudon (38) gilt für 180°-Rückstreuungsgeometrie folgendes:

$$I_{ML}^{obs} = \frac{R \cdot I_o}{[\epsilon_M(\tilde{\nu}_L) + \epsilon_L(\tilde{\nu}_S)] \cdot C' \cdot d} \cdot \{1 - \exp[\epsilon_M(\tilde{\nu}_L) + \epsilon_L(\tilde{\nu}_S)] \cdot C' \cdot d\}$$

/ 33 /

I_{ML}^{obs} ist die beobachtete Raman-Intensität an der Kristall-oberfläche (für die Lösung die bestrahlte Kontaktfläche zwischen der Lösung und der Glasküvette), an der der Erregerstrahl in den Kristall (bzw. in die Lösung) eindringt.

R: ist proportional zum Raman-Tensor.

I_o : die Anregungsintensität,

$\epsilon_M(\tilde{\nu}_L)$, $\epsilon_L(\tilde{\nu}_S)$: die Extinktionskoeffizienten für das anregende Laserlicht der Frequenz ($\tilde{\nu}_L$) und das gestreute Licht der Frequenz ($\tilde{\nu}_S$).

C' : Konzentration des absorbierenden Stoffes

d: die Dicke der streuenden Probe (Kristall bzw. Lösung), die im Eintrittsspalt des Spektrometers abgebildet wird.

Wenn die Probe eine kleine optische Dichte hat, d.h.

$[\epsilon_M(\tilde{\nu}_L) + \epsilon_L(\tilde{\nu}_S)] \cdot C' \cdot d \ll 1$, so erhält man:

$$I_{ML}^{obs} = R \cdot I_o \cdot d = I_{ML} \cdot d$$

In diesem Fall muß keine Korrektur durchgeführt werden. Das trifft für die Lösungsmessung zu (siehe II § 2.2.3.3).

Gilt aber $[\epsilon_M(\tilde{\nu}_L) + \epsilon_L(\tilde{\nu}_S)] \cdot C' \cdot d \gg 1$, so erhält man folgende Korrekturformel:

$$I_{ML}^{obs} = \frac{R \cdot I_o}{[\epsilon_M(\tilde{\nu}_L) + \epsilon_L(\tilde{\nu}_S)] \cdot C' \cdot d} = \frac{I_{ML}}{[\epsilon_M(\tilde{\nu}_L) + \epsilon_L(\tilde{\nu}_S)] \cdot C' \cdot d} \quad / 34 /$$

Dieser Fall trifft für die Kristallmessungen zu und die Intensitäten wurden danach korrigiert (siehe II § 2.2.3.3).

Aus /34/ und /32/ erhalten wir schließlich folgende Beziehung zwischen den gemessenen Ramanintensitäten und den Koeffizienten des Raman-Tensors im Kristall-Koordinatensystem:

$$| \beta_{LM} |^2 = \frac{A'_C \cdot I_{ML}^{Obs}}{I_o \cdot \tilde{\nu}_S^4} \cdot [\epsilon_M(\tilde{\nu}_L) + \epsilon_L(\tilde{\nu}_S)] \quad / 35 /$$

Die Extinktionskoeffizienten $\epsilon_M(\tilde{\nu}_L)$ bzw. $\epsilon_L(\tilde{\nu}_S)$ bekommt man aus der polarisierten optischen Absorption an Kristallen. Dies wird im Abschnitt II § 2.1.2.4 behandelt.

II. Die experimentelle Methode

1. Präparatives

1.1. Präparation der Myoglobinlösungen

1.1.1 Herstellung der Stammlösung

Myoglobin (Mb) von Sperm Wal wurde kommerziell von der Firma (Miles) in lyophilisierter Form erhalten; es wurde in bidestilliertem Wasser aufgelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde dann gegen bidestilliertes Wasser dialysiert, um eine salzfreie Mb-Lösung zu erhalten. Solche Lösungen haben im allgemeinen eine sehr hohe Fluoreszenz, verursacht durch die denaturierten Proteinreste, und damit sind sie für Raman-Messungen in diesem Zustand nicht geeignet. Die Lösung kann durch einen Ionenaustauscher (DEAE-Sephadex A-50) oder durch ein Gelsieb (SEPHADEX G 100) gereinigt werden. Eine bessere Reinigungsmethode ist die Kristallisation (s. 1.2.1).

Mb-Kristalle wurden mit 3-molarer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung mehrmals gewaschen, um das denaturierte Material zu entfernen. Sie wurden dann im bidestillierten Wasser aufgelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde dann gegen bidestilliertes Wasser 48 Stunden bei 4°C dialysiert. Die so erhaltene Mb-Stammlösung ist fast fluoreszenzfrei. Ihre Konzentration lag im Bereich von $(1-5) \times 10^{-4}$ Mol/l.

1.1.2 pH-Wert-Einstellung

Zur Einstellung des pH-Wertes wurde die Stammlösung gegen 0.1-mol. Tris-Puffer für den Bereich zwischen pH 7 und pH 9 und 0.1-mol. Bis-Tris-Puffer für den Bereich zwischen pH 4 und pH 7; 24 Stunden lang bei $\approx 4^\circ\text{C}$ dialysiert.

1.1.3 Herstellung der Derivate

a) Deoxy-Mb

wird durch Zugabe von Natriumdithionid ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) an die Stammlösung in einer Stickstoffatmosphäre gewonnen. Der pH-Wert muß nach dieser Reduktion wieder eingestellt werden, da das Natriumdithionid den pH-Wert der Mb-Lösung verschiebt.

b) Met-Mb-CN

wird durch Zugabe von Kaliumcyanid (KCN) an die Stammlösung gewonnen. Nach der Reaktion muß der pH-Wert der Lösung korrigiert werden. KCN in Lösung ist sehr alkalisch und entweicht bei niedrigen pH-Werten als HCN aus der Lösung heraus. Deshalb wurde die Mb-Lösung im sauren Bereich nach der Zugabe von KCN ohne erneute pH-Werteinstellung zur Ramanmessung verwendet.

c) Met-Hb-CN

Zur Herstellung von Met-Hämoglobin-Cyanid (Met-Hb-CN) muß das Oxy-Hämoglobin (Oxy-Hb) zuerst oxidiert werden. Dies geschieht durch Zugabe von $(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ an (Oxy-Hb). Der Überschuß von $(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ wird durch die Dialyse gegen bidestilliertes Wasser oder den gewünschten Puffer entfernt. Somit bekommt man Met-Hb-Lösung, die durch Zugabe von KCN zum Met-Hb-CN übergeht. Die Güte der hergestellten Derivate wurde photometrisch festgestellt.

1.2. Präparation der Kristalle

1.2.1 Kristallzüchtung

Das Myoglobin von Sperm Wal läßt sich in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Lösung leicht kristallisieren.

Nach der Methode von Kendrew et al. (4) wird die in 1.1.1 beschriebene Stammlösung mit einer Konzentration von $\approx 3 \times 10^{-3}$ M ($\approx 5\%$) hergestellt und zu kleineren Mengen (ca. 2 ml) in

Reagenzgläser verteilt. Die gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wird dann allmählich zugegeben bis das Gemisch anfängt sich zu trüben. Die Kristallisation beginnt innerhalb einiger Stunden bei Zimmertemperatur oder 4°C und kann einige Tage oder Wochen dauern. Die besten Kristalle wachsen im pH-Bereich zwischen 6.5 und 7.3. Der pH-Wert wird durch Zugabe eines Tropfens des starken Phosphat-Puffers stabilisiert. Takano (5) verwandte 6%ige Mb-Stammlösung (1 ml) und 100%ige $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (2.5 ml) mit einem pH-Wert von 5.75 ohne Phosphat-Puffer. Diese Mischung liefert die besten Kristalle vom Typ A Raumgruppe P_{21} mit ausgeprägter (axb)-Fläche $\{001\}$. Um Kristalle mit ausgeprägter (bxc)-Fläche $\{100\}$ zu erhalten, muß der pH-Wert größer als 7.0 sein (4). Dies wird durch einen starken Phosphat-Puffer erreicht. Die gezüchteten Kristalle können in ihrer Mutterlösung für mehrere Jahre bei Zimmertemperatur oder 4°C aufbewahrt werden.

Die für die Ramanmessungen benutzten Kristalle hatten im allgemeinen folgende Dimensionen:

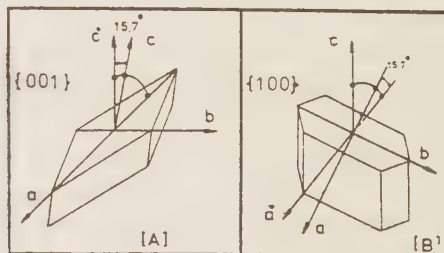
a-Achse: 3-4 mm; b-Achse: 1-2 mm; c^* -Achse: 0.1-1 mm.

und für die optischen Messungen:

a-Achse: 200-350 μm ; b-Achse : 150-250 μm ; c^* -Achse: 10-50 μm oder:

a^* -Achse: 20-50 μm ; b-Achse : 150-250 μm ; c-Achse: 50-100 μm .

Die Kristallachsen a, b, c^* beschreiben Kristalle mit ausgeprägter (axb)-Fläche. Hier ist c^* die Dicke des Kristalls. Die Achsen a^* , b, c beschreiben Kristalle mit ausgeprägter (bxc)-Fläche. Die Kristalldicke hier ist a^* . (s. Kapitel I § 2.2.3a).



1.2.2 Herstellung der Mb-Kristallderivate

a) Deoxy-Mb

wird durch Zugabe von ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) an die Kristalle in ihrer Mutterlösung unter Ausschluß von Sauerstoff gewonnen. Die Reaktionszeit hängt von der Kristalldicke ab und kann von 15 bis 60 Minuten dauern.

b) Mb-CN

wird durch Zugabe von KCN an die Met-Mb-Kristalle in ihrer Mutterlösung gewonnen. Die Reaktionszeit ist ebenfalls von der Kristalldicke abhängig und beträgt 10 bis 60 Minuten.

Hier soll noch erwähnt werden, daß die Molarität von ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) oder (KCN) in der Mutterlösung nicht 0.1 Mol übersteigen soll, da sonst die Kristalle rissig und damit unbrauchbar werden. Die Güte des hergestellten Derivates wurde photometrisch oder spektroskopisch festgestellt.

2. Apparatives

2.1 Aufnahme der optischen Spektren

2.1.1 Aufnahme der Lösungsspektren

2.1.1.1 Apparatur

Zur Ermittlung der optischen Absorption im sichtbaren und ultravioletten Bereich wurde das Photometer Cary 17D verwendet.

2.1.1.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration wurde mit Hilfe der aus der Literatur bekannten Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\tilde{\nu})$ ermittelt. Tabelle (2) zeigt diese Daten.

Derivat	Q _v -Bande (nm)	(M·cm) ⁻¹	B-Bande (nm)	(M·cm) ⁻¹
MbO ₂	543	13.6	418	128
Mb	556	11.8	434	115
MbCN	540	10.7	423	109.7
HbO ₂	540	14.1	415	129
Hb	555	12.9	430	130
HbCN	542	10.9	422	114

Tabelle (2): Die millimolaren Extinktionskoeffizienten verschiedener Mb- und Hb-Derivate nach(3 , 28)

2.1.2 Aufnahme der polarisierten optischen Kristallspektren

2.1.2.1 Apparatur

Zur Aufnahme der optischen Kristallspektren wurde ein Leitz-Mikrophotometer (MPV 2) verwendet.

Abb. (9) zeigt in schematischer Darstellung diese Meßanordnung.

Das Licht der Xenon-Lampe (L) wird durch den Monochromator (M) zerlegt und mit Hilfe des Abbildungssystems parallelisiert. Der Polarisator (P) sorgt für die lineare Polarisation des ankommenden Lichtes. Der linear polarisierte Lichtstrahl wird mit Hilfe einer Irisblende und des Kondensors (Ko) auf die Kristalloberfläche fokussiert. Man sollte mit der kleinstmöglichen Öffnung arbeiten, um die Meßfehler, die durch nicht parallele Lichtstrahlen zustandekommen können, so klein wie möglich zu halten. Bei größerer Öffnung fällt ein Teil des

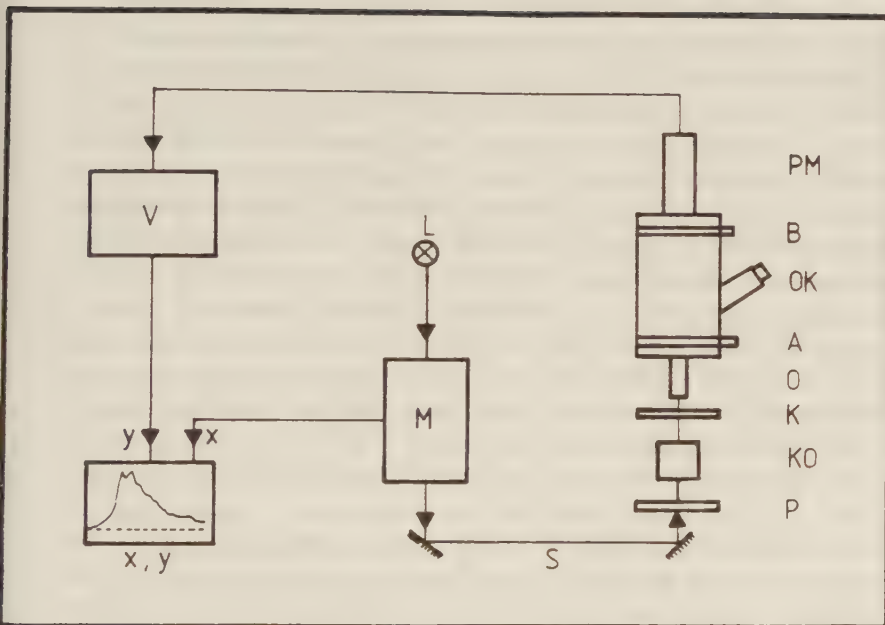


Abb. 9: Meßanordnung zur Aufnahme der optischen Spektren von Kristallen (Mikrophotometer Leitz MPV 2).

- | | |
|--|----------------------------|
| L: Xenonlampe (500W) als Lichtquelle | A : Analysator |
| M: Monochromator | B : Verstellbare Meßblende |
| S: Abbildungssystem zur Parallelisierung des Lichtstrahles | OK: Okular |
| P: Polarisator | PM: Photomultiplier |
| KO: Kondensor | V : Verstärker |
| K: Kristall | x,y:Schreiber |
| O: Objektiv | |

Lichtstrahles nicht senkrecht auf die Kristalloberfläche. Sein $\vec{E}$ -Vektor verläuft dann nicht parallel zur zu messenden Kristallachse und dadurch entsteht ein Meßfehler.

Der Kristallhalter (K) besteht aus einem Glasobjektträger mit einer Vertiefung und einem planaren Glasdeckel. Die Kristalle befinden sich in ihrer Mutterlösung. Der Objektträger wird auf einem drehbaren Tischchen am Mikroskop so montiert, daß der planare Deckel unten liegt. Dies ist notwendig, um den zu untersuchenden Kristall senkrecht zum einfallenden Lichtstrahl festhalten zu können und der einfallende Lichtstrahl keine Brechung beim Eintritt in den Objektträger erfährt. Das beleuchtete Feld muß kleiner als die Kristalloberfläche sein, um störendes Streulicht zu vermeiden. Das Objektiv (O) bildet das beleuchtete Feld in der Ebene der verstellbaren Meßblende (B) ab. Die Öffnung dieser Blende muß kleiner als das beleuchtete Feld sein, um nicht erwünschtes Streulicht zu eliminieren.

Der Analysator (A) kann in den Strahlengang eingeschaltet werden, um die genaue Lage der Kristallachsen zu bestimmen (siehe nächsten Abschnitt). Der Lichtstrahl kann durch ein optisches System zum Okular (OK) oder zum Photomultiplier (PM) umgelenkt werden. Das vom (PM) erzeugte Signal wird mit der Verstärker (V) verstärkt und am y-Eingang eines x-y-Schreibers eingegeben. Der x-Eingang wird am Monochromator (M) angeschlossen und somit kann die Wellenlänge des verwendeten monochromatischen Lichtes registriert werden.

Entscheidend für die polarisierte optische Absorptionsmessung sind die korrekte Orientierung der Kristallachsen und die richtige Kristalldicke. Diese werden im folgenden behandelt.

2.1.2.2 Bestimmung der Kristallachsen

Der Sperm-Wal-Myoglobinkristall ist ein monokliner Kristall mit einer zwei-zähligen Schraubenachse (b-Achse) (s. I., 1.4). Fällt linear polarisiertes Licht mit dem elektrischen $\vec{E}$ -Vektor

parallel zu dieser Achse oder senkrecht dazu ein, so bleibt es nach Verlassen des Kristalls linear polarisiert (Eaton (28)). Fällt es dagegen mit dem $\vec{E}$ -Vektor zwischen den beiden genannten Stellungen ein, so wird es elliptisch polarisiert.

Durch diese Eigenschaft kann man die Kristallachsen sehr leicht wie folgt bestimmen: Der Polarisator (P) wird relativ zum Objekttrichter in eine bestimmte Stellung gebracht, z.B. 0° oder 90° . Der Analysator (A) wird gekreuzt zum Polarisator eingestellt. Der Kristall wird in den Strahlengang eingesetzt. Der Analysator (A) läßt dann im allgemeinen eine gewisse Intensität durch. Der Kristall wird dann mit Hilfe des Drehtisches so weit gedreht, bis die durch den Analysator durchgelassene Intensität wieder Null wird. In diesem Fall ist der $\vec{E}$ -Vektor des vom Polarisator (P) polarisierten Lichtes parallel zur b-Achse des Kristalls oder senkrecht dazu. Falls der $\vec{E}$ -Vektor parallel zur b-Achse liegt, ist der Extinktionskoeffizient größer als im Fall des $\vec{E}$ -Vektors parallel zur a-Achse. Deshalb ist es möglich die Kristallachsen voneinander zu unterscheiden.

Die zweite wichtige Randbedingung ist die Auswahl der richtigen Kristalldicke. Diese hängt von dem Meßbereich ab, da die Extinktionskoeffizienten der Soret- und α -Bande sich um eine Größenordnung unterscheiden. Damit man ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis bekommt, soll die optische Dichte nicht größer als 4 sein. Die Kristalldicke läßt sich dann für jeden Meßbereich ausrechnen, da die Mb-Konzentration im Kristall bekannt ist (0.05 Mol/l).

2.1.2.3 Aufnahme der polarisierten optischen Spektren

Das Meßverfahren beruht auf der Messung der vom Kristall durchgelassenen Intensität unter Annahme, daß das Lambert-Beersche Gesetz hier seine Gültigkeit hat. Eaton und Hochstraßer (23) bestätigten experimentell diese Annahme.

Das Lambert-Beersche Gesetz lautet:

$$I^M = I_o^M \cdot \exp(-\epsilon_M(\tilde{\nu}) \cdot C \cdot d) \quad / 36 /$$

M : kennzeichnet die Kristallachsen. M = b, a für Kristalle mit ausgeprägter (axb)-Fläche und M = b, c für Kristalle mit ausgeprägter (bxc)-Fläche. Der $\vec{E}$ -Vektor des linear polarisierten Lichtes ist hier parallel zur M-Achse.

I^M : die vom Kristall durchgelassene Intensität

I_o^M : die Intensität des einfallenden Lichtstrahles

$\epsilon_M(\tilde{\nu})$: der Extinktionskoeffizient

C : die Konzentration des absorbierenden Stoffes

d : die Kristalldicke.

Als optische Dichte oder Extinktion bezeichnet man die folgende Beziehung:

$$\ln \frac{I_o^M}{I^M} = OD_{||M} = \epsilon_M(\tilde{\nu}) \cdot C \cdot d \quad / 37 /$$

Als Polarisationsverhältnis bezeichnet man den Ausdruck

$$\frac{OD_{||b}}{OD_{||a}} \quad \text{bzw.} \quad \frac{OD_{||c}}{OD_{||b}}$$

Die optische Dichte ($OD_{||M}$) wird durch die Messung der Intensitäten I_o^M und I^M bestimmt. Die beiden Intensitäten wurden nicht gleichzeitig sondern getrennt gemessen. Dies war durch die Meßapparatur, die mit dem Einstrahlverfahren arbeitet, bedingt. Dies wurde wie folgt durchgeführt: Zuerst wird der Polarisator eingestellt (0° oder 90°). Eine Kristallachse wird dann durch Drehen des Kristalls parallel zum $\vec{E}$ -Vektor des einfallenden Lichtes festgelegt. Der Drehtisch wird dann arretiert und der Analysator entfernt.

I_O^M wurde gemessen, indem wir den Kristall durch kleine Translationsbewegungen vom Strahlengang entfernten. Zwei I_O^M -Messungen waren hier notwendig (z.B. I_O^b und I_O^a), weil der Monochromator eine polarisationsabhängige Transmission besitzt. Die wiederholten Messungen von I_O^M zeigten, daß ihre Schwankungen kleiner als die Meßfehler waren.

I^M wurde dann gemessen, indem wir den Kristall wieder in den Strahlengang zurückbrachten. Alle Einstellungen blieben hier unverändert. Der Polarisator wurde dann um 90° gedreht und die andere Intensität gemessen.

2.1.2.4 Die Beziehung zwischen den Extinktionskoeffizienten im Kristall und in Lösung

Die Lichtabsorption eines Moleküls wird quantenmechanisch durch folgende Beziehung beschrieben:

$$P(n \rightarrow m) = \langle \psi_m | \sum_i e r_i | \psi_n \rangle \quad / 38 /$$

$P(n \rightarrow m)$ ist das elektrische Übergangsdipolmoment zwischen dem Grundzustand n und dem angeregten Zustand m .

ψ_m, ψ_n : sind die entsprechenden Wellenfunktionen

$\sum_i e r_i$: ist der elektrische Dipol-Operator aller Teilchen des Moleküls (Elektronen + Kerne).

Verwendet man die adiabatische Näherung, so läßt sich die Wellenfunktion ψ als Produkt aus der elektronischen Wellenfunktion φ und der vibronischen χ darstellen. Es gilt:

$$\psi_n = \varphi_n \cdot \chi_n \quad \text{bzw.} \quad \psi_m = \varphi_m \cdot \chi_m$$

Setzen wir diese Beziehung in Gleichung /38/ ein, so erhalten wir:

$$P(n \rightarrow m) = \langle \varphi_m | \sum_i e r_i | \varphi_n \rangle \langle \chi_m | \chi_n \rangle \quad / 39 /$$

Die Summe geht hier nur über die Elektronen des Systems.

Das erste Integral gibt das elektrische Übergangsmoment bei in Gleichgewichtslage festgehaltenen Kernen an. Das zweite Integral ist das Franck-Condon-Überlappingsintegral. Die möglichen Richtungen des Übergangsmomentes im Molekül sind bestimmt durch die Symmetrieeigenschaften der Wellenfunktionen, die ihrerseits von der Symmetrie des Hämoleküls abhängen.

Unter Vernachlässigung der Seitengruppen kann man der Hämgruppe eine D_{4h} -Symmetrie zuordnen. Die obersten besetzten Orbitale transformieren sich wie A_{1u} und A_{2u} . Das erste unbesetzte Orbital ist zweifach entartet und transformiert sich wie E_g (Goutermann (27)). Das verbietet den z-polarisierten Übergang und erlaubt den senkrechten dazu (x,y)-polarisiert). Das Hämolekül absorbiert in diesem Fall wie ein Zirkularabsorber, wenn der $\vec{E}$ -Vektor des einfallenden Lichtes in der Hämebene liegt (Eaton (28)).

Da die Wechselwirkung zwischen den Hämolekülen im Mb-Kristall keinen Einfluß auf die optischen Spektren hat (orientierte Gasphase), kann man die Extinktionskoeffizienten des Kristalls als Funktion des molekularen Extinktionskoeffizienten, die aus Absorptionsmessungen der gelösten Mb-Kristalle erhältlich sind, darstellen.

Diese Darstellung ist theoretisch wie folgt begründet:

Die Absorptionswahrscheinlichkeit von linear polarisiertem Licht im Kristall ist proportional dem Quadrat der Projektion des einfallenden $\vec{E}$ -Vektors auf die Richtung des $\vec{E}$ -Vektors des Dipolmomentes. Hofrichter und Eaton (39) gaben folgende verallgemeinerte Beziehung zwischen den molekularen Extinktionskoeffizienten ϵ_x , ϵ_y und ϵ_z im orthogonalen Molekülsystem x, y, z und den Kristallextinktionskoeffizienten ϵ_a , ϵ_b und ϵ_c im orthogonalen Kristallsystem a, b, c^* an:

$$\epsilon_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\epsilon_x \cos^2(x_i a) + \epsilon_y \cos^2(y_i a) + \epsilon_z \cos^2(z_i a))$$

$$\epsilon_b = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\epsilon_x \cos^2 (x_i b) + \epsilon_y \cos^2 (y_i b) + \epsilon_z \cos^2 (z_i b))$$

$$\epsilon_{c^*} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\epsilon_x \cos^2 (x_i c^*) + \epsilon_y \cos^2 (y_i c^*) + \epsilon_z \cos^2 (z_i c^*))$$

/ 40 /

ϵ_M : mit $M = a, b, c$ bedeutet, daß der einfallende $\vec{E}$ -Vektor parallel zu der jeweiligen Kristallachse ist.

n : Anzahl der nicht identisch orientierten Hämoleküle in der Einheitszelle

$\cos_{k_i L}$: mit $k = x, y, z$ und $L = a, b, c^*$ ist der Richtungskosinus zwischen der k -ten Molekülachse und der L -ten Kristallachse für das i -te Molekül.

In Lösungen sind die Moleküle statistisch orientiert. Die Absorptionsmessungen liefern hier gemittelte Extinktionskoeffizienten . Es gilt

$$\bar{\epsilon} = \frac{1}{3} (\epsilon_x + \epsilon_y + \epsilon_z) \quad / 41 /$$

Berücksichtigen wir jetzt unseren Sonderfall (Myoglobin Kristall Typ A), in welchem $\epsilon_x = \epsilon_y$, $\epsilon_z = 0$ und $n = 1$ gilt (eigentlich ist $n = 2$, aber das zweite Hämolekül in der Einheitszelle hat dem Betrag nach die gleichen Richtungskosinus wie das erste und dadurch reduziert sich ihre Anzahl auf $n = 1$. Siehe Tabelle 7), so erhalten wir aus Gleichung / 40 / und / 41 / folgende Beziehungen:

a) Für das orthogonale Kristallsystem a, b, c^* , das die Kristalle mit ausgeprägter (axb)-Fläche beschreibt, gilt:

$$\left. \begin{aligned} \epsilon_a &= \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (\cos^2 (x a) + \cos^2 (y a)) = \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (1 - \cos^2 (z a)) \\ \epsilon_b &= \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (\cos^2 (x b) + \cos^2 (y b)) = \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (1 - \cos^2 (z b)) \\ \epsilon_{c^*} &= \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (\cos^2 (x c^*) + \cos^2 (y c^*)) = \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (1 - \cos^2 (z c^*)) \end{aligned} \right\} / 42a /$$

b) Für das orthogonale Kristallsystem a^*, b, c , das die Kristalle mit ausgeprägter (bxc) -Fläche beschreibt, gilt:

$$\left. \begin{aligned} \epsilon_{a^*} &= \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (\cos^2 (x a^*) + \cos^2 (y a^*)) = \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (1 - \cos^2 (z a^*)) \\ \epsilon_b &= \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (\cos^2 (x b) + \cos^2 (y b)) = \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (1 - \cos^2 (z b)) \\ \epsilon_c &= \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (\cos^2 (x c) + \cos^2 (y c)) = \frac{3}{2} \bar{\epsilon} (1 - \cos^2 (z c)) \end{aligned} \right\} / 42b /$$

Die rechte Seite der Beziehungen in / 42a / und / b / ergibt sich aus der Orthogonalitätsbedingung:

$$\cos^2(xL) + \cos^2(yL) + \cos^2(zL) = 1$$

$$L = a, b, c^* \quad \text{oder} \quad L = a^*, b, c$$

Aus Gleichungen / 42a / und / 42b / kann man die Richtungskosinus der molekularen z-Achse, hier der Hämnormalen bestimmen, indem man die Extinktionskoeffizienten des Kristalls mißt.

Für das Polarisationsverhältnis erhält man:

$$\frac{\epsilon_b}{\epsilon_a} = \frac{OD_{\parallel b}}{OD_{\parallel a}} = \frac{1 - \cos^2 (z b)}{1 - \cos^2 (z a)} \quad / 43a /$$

$$\text{oder} \quad \frac{\xi_c}{\xi_b} = \frac{OD_{\parallel c}}{OD_{\parallel b}} = \frac{1 - \cos^2(z c)}{1 - \cos^2(z b)} \quad / 43b /$$

Aus Gleichung /43a/ und /43b/ kann man nun die Richtungskosinus der Hämnormalen ohne Kenntnis der Kristalldicke und der Konzentration bestimmen. Dies ist in Kapitel IV § 3.1 erläutert.

2.2 Aufnahme der Raman-Spektren

2.2.1 Raman-Apparatur

2.2.1.1 Aufbau

Abb. (10) zeigt den prinzipiellen Aufbau dieser Apparatur. Als Lichtquelle diente ein Ar^+ -Ion-Laser. Der Lichtstrahl wurde mit einer Zylinderlinse ($f = 7.5 \text{ cm}$) auf die Probe fokussiert. Durch Linsensysteme wird das in den Raumwinkel Ω gestreute Licht auf den Eintrittsspalt des Monochromators abgebildet. Ein Cerny-Turner-Monochromator (Spex 104) dient zur spektralen Zerlegung des Streulichtes. Die Intensität des zerlegten Lichtes wird mit Hilfe des Photomultipliers (RCA-C 31034A) und des Photonen-zähl-systems (ORTEC-9315) gemessen. Der zwischen dem Linsensystem und dem Eintrittsspalt eingesetzte Polarisator ermöglichte die Bestimmung von $I_{\parallel}$, $I_{\perp}$ bzw. I_{ML} . Der vor dem Eintrittsspalt eingesetzte Polarisations-scrambler diente zur Eliminierung des Transmissionsunterschiedes des Monochromators für verschiedene Polarisationen.

Die Polarisation des Laserstrahles wird mit einem Polarisationsdreher eingestellt. Für die Messungen von Lösungen wird der $\vec{E}$ -Vektor senkrecht zur Streuebene eingestellt und für die Kristallmessungen werden die beiden Richtungen senkrecht oder parallel zur Streuebene verwendet.

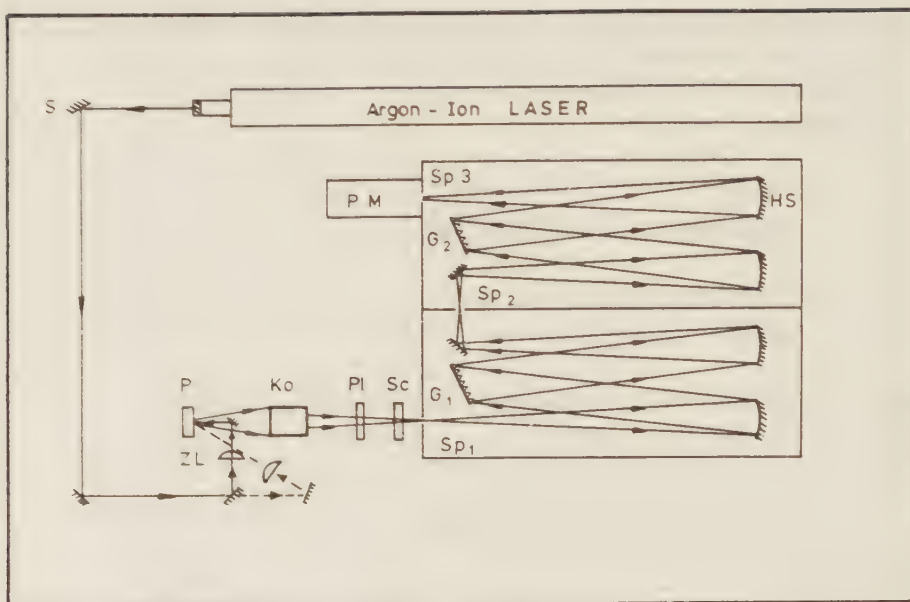


Abb. 10: Meßanordnung zur Aufnahme der Raman-Spektren

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------|
| S : Umlenkspiegel | P : Probe |
| HS: Hohlspiegel | Ko: Linsensystem (Kollimator) |
| ZL: Zylinderlinse | Pl: Polarisator |
| Sc: Polarisations-Scrambler | Sp: Spalt |
| G : Monochromator-Gitter | PM: Photomultiplier |

Die Laserintensität I_0 wird vor der Probe mit einem Leistungsmesser gemessen und während der Raman-Messungen gleichzeitig registriert.

Die Spaltbreite betrug $200 \mu\text{m}$. Das entspricht einer spektralen Halbwertsbreite von $\approx 6 \text{ cm}^{-1}$. Die Zeitkonstante betrug 3 s und die Scan-Geschwindigkeit $0.5 \text{ cm}^{-1}/\text{s}$.

2.2.1.2 Ermittlung der Transmission des Spektrometers

Zur Ermittlung der Transmission des Spektrometers wurden die Raman-Spektren eines Quarzkristalls (Raman-Linie 466 cm^{-1}) gemessen. Der Quarzkristall eignet sich für diese Aufgabe, da er keine resonante Ramanstreuung im Frequenzbereich von 450 bis 528 nm zeigt (Long (40)). Die gemessene Raman-Intensität I_μ^R der μ Laser-Frequenz läßt sich wie folgt ausdrücken:

$$I_\mu^R = I_\mu^0 \cdot \tilde{\nu}_s^4 \cdot R \cdot T(\tilde{\nu}_s) \quad / 44 /$$

I_μ^0 ist die Intensität der einfallenden Laserstrahlung, $\tilde{\nu}_s$ die Frequenz des gestreuten Lichtes, R der frequenzunabhängige Streutensor und $T(\tilde{\nu}_s)$ die Transmissionsfunktion. Da wir mit willkürlichen Einheiten arbeiten, wurde die Transmission $T(\tilde{\nu}_s)$ auf die bei der Frequenz $21372.3 \text{ cm}^{-1} = 467.9 \text{ nm}$ erhaltene Transmission normiert. Dies entspricht der Anregung mit der Laser-Linie 457.9 nm . Abb. (11) zeigt die gemessene Transmission $T(\tilde{\nu}_s)$.

Zusätzlich wurde die Absorption des Polarisators gemessen, um den zusätzlichen Verlust der gestreuten Intensitäten zu berücksichtigen. Abb. (12) zeigt diese Absorption. Die Intensitätskorrektur bezüglich der Transmission und des Polarisators wurde dann wie folgt durchgeführt:

$$I(\tilde{\nu}_s) = \frac{I^{\text{obs}}(\tilde{\nu}_s) \cdot \exp[E(\tilde{\nu}_s)]}{T(\tilde{\nu}_s)} \quad / 45 /$$

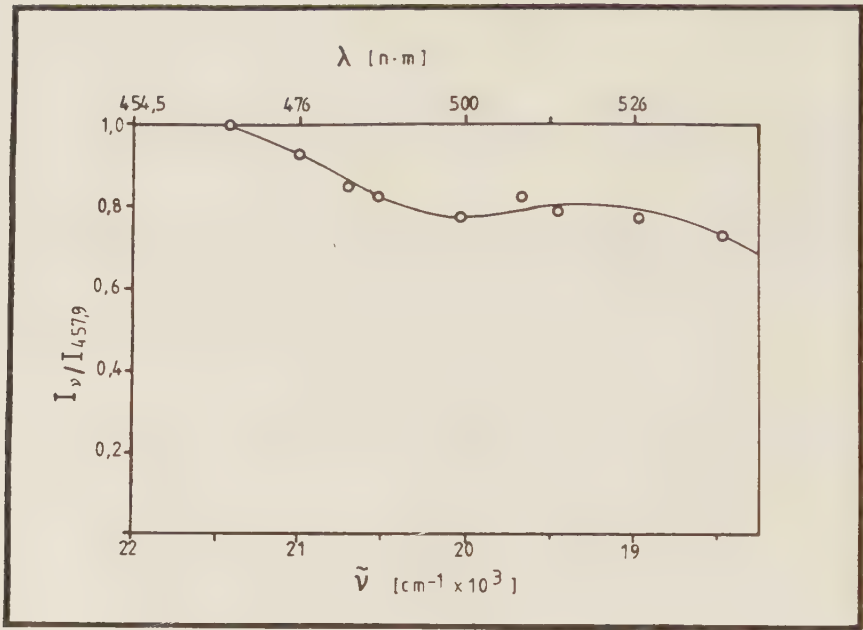


Abb. 11: Transmissionskurve des Spektrometers.

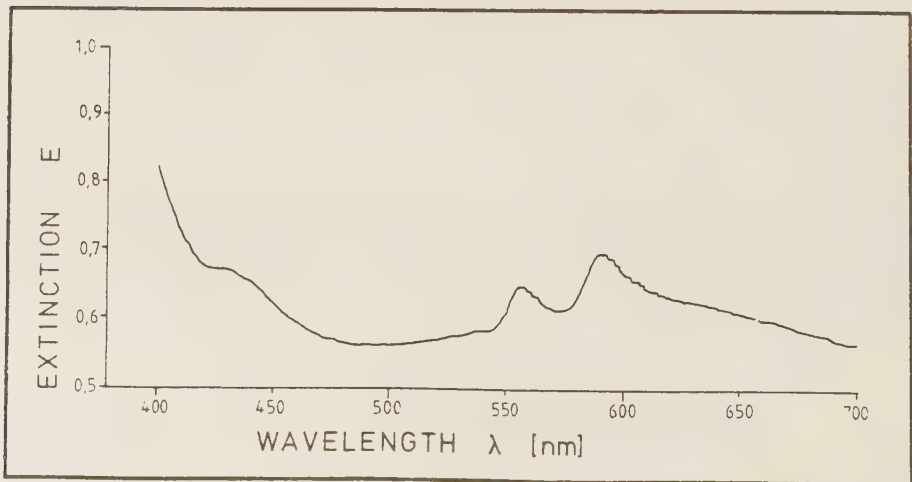


Abb. 12: Absorptionsspektrum des Polarisators (Spindler & Hoyer).

$I(\tilde{\nu}_s)$: ist die korrigierte Raman-Intensität

$I^{\text{obs}}(\tilde{\nu}_s)$: ist die gemessene Raman-Intensität

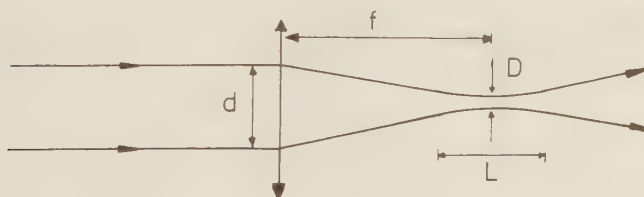
$E(\tilde{\nu}_s)$: ist die Extinktion des Polarisators.

2.2.1.3 Berechnung der vom Spektrometer erfaßten Probendicke

Zur Berechnung der optischen Absorption in der zu messenden Probe muß das vom Spektrometer erfaßte Probenvolumen berechnet werden. Uns interessiert hier in erster Ordnung die Probendicke in diesem Volumen längs der Fortpflanzungsrichtung des Laserstrahles und längs der Beobachtungsrichtung des gestreuten Lichtes. Dies wird wie folgt berechnet:

Trifft ein paralleler Lichtstrahl mit dem Durchmesser d auf eine Linse mit Brennweite f , so gelten für den Fokusbereich D und die Fokuslänge L des Bildes nach Barret und Adams (41) folgende Beziehungen:

$$D = \frac{4 \cdot \lambda \cdot f}{\pi \cdot d} \quad ; \quad L = \frac{16 \cdot \lambda \cdot f^2}{\pi \cdot d^2} \quad / 46 /$$



Unser optisches System besitzt folgende Daten:

$f = 75 \text{ mm}$, $d = 3 \text{ mm}$.

Der Fokusbereich D und seine Länge L lassen sich nach Gleichung / 46 / für eine bestimmte Wellenlänge λ , z.B. $\lambda = 488 \text{ nm}$, berechnen.

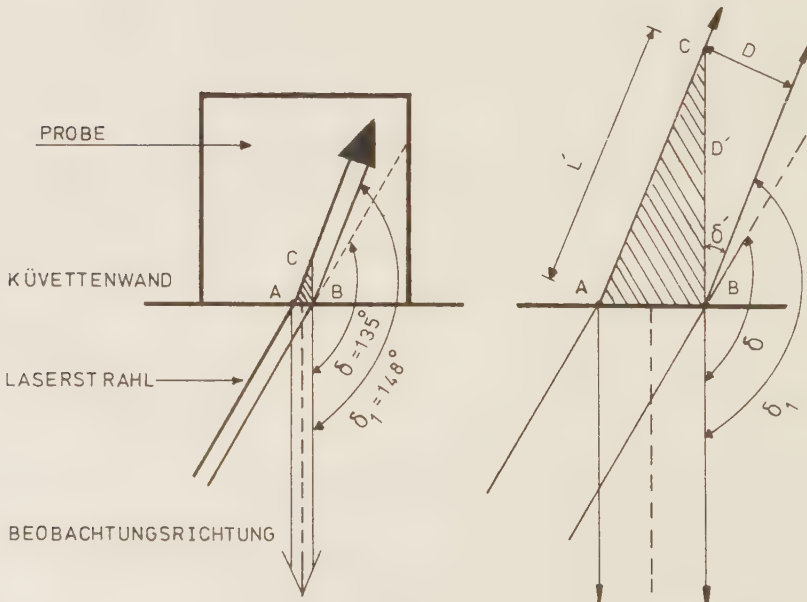
Dies ergibt: $D = 15.5 \mu\text{m}$, $L = 1553 \mu\text{m}$.

Die vom Kondensor erfasste Probendicke lässt sich einfach berechnen. (siehe Anhang II). Diese ist gleich 0.344 mm für eine Spaltbreite von $250 \mu\text{m}$. Die Probendicke wird für die Korrektur der gemessenen Intensitäten bezüglich der Absorption verwendet.

2.2.2 Aufnahme der Lösungsspektren

2.2.2.1 Geometrie

Die Proben wurden in einer Quarzküvette von ca. 4 cm^3 Volumen untergebracht. Ein Kühlsystem sorgte für konstante Temperatur (bei 4°C). Der Laser-Strahl wurde senkrecht zur Streuebene polarisiert. Der Winkel zwischen der Einfallsrichtung des Laserstrahles und der Beobachtungsrichtung betrug $\delta = 135^\circ$.



Nach Berücksichtigung der Brechung (Luft-Wasser) ergibt sich für den Winkel δ_1 zwischen Beobachtungsrichtung und der Fortpflanzungsrichtung des Laserstrahles in der Probe: $\delta_1 = 148^\circ$. (Einfallswinkel 45° , Brechungsindex für das Wasser = 1.33)
Die maximal erfaßte Dicke D' beträgt in diesem Fall:

$$D' = \frac{D}{\sin \delta'} = \frac{15,5}{0,53} = 29,25 \mu\text{m}$$

und die entsprechende Eindringtiefe des Laserstrahles in die Probe

$$L' = 34 \mu\text{m}$$

Die beobachtete Intensität wurde dann mit Hilfe des Analysators einmal parallel zum $\vec{E}$ -Vektor ($I_{||}$) und dann senkrecht dazu ($I_{\perp}$) gemessen.

2.2.2.2 Korrektur der Intensität

Die Konzentration C des Mb in der Lösung lag zwischen 10^{-3} und 10^{-4} Mol/l. Der Extinktionskoeffizient liegt in der Größenordnung von $\epsilon = 10 \text{ (mMol} \cdot \text{cm)}^{-1}$. Die maximal erfaßte Eindringtiefe des Laserstrahles in die Probe L' betrug $34 \mu\text{m}$.

Für die Extinktion E gilt dann:

$$E = \epsilon \cdot C \cdot L' \longrightarrow 34 \cdot 10^{-4} < E < 34 \cdot 10^{-3}$$

D.h. $E \ll 1$. Eine Korrektur ist deshalb nicht notwendig (siehe Kapitel I § 2.2.4).

Die Intensitäten wurden auf die Konzentration $C_0 = 8 \cdot 10^{-4}$ Mol/l und $I_0 = 1\text{W}$ normiert. Aus Gleichungen /19/ und /45/ bekommen wir die Endformel der Intensitätsprofile. Sie lautet:

$$I(\tilde{\nu}_s) = \frac{I^{\text{obs}}(\tilde{\nu}_s) \cdot \exp[E(\tilde{\nu}_s)] \cdot 8 \cdot 10^{-4}}{\tilde{\nu}_s^4 \cdot I_0 \cdot T(\tilde{\nu}_s) \cdot C} \quad / 47 /$$

Hier wurden folgende Einheiten benutzt:

$$\begin{aligned} I^{\text{obs}}(\tilde{\nu}_s) &= \text{mV} \\ I_o &= \text{W} \\ C &= \text{Mol/l (Monomer)} \\ \tilde{\nu}_s &= \text{cm}^{-1} \end{aligned}$$

2.2.3 Aufnahme der Kristallspektren

2.2.3.1 Geometrie

Diese Spektren wurden in 180° -Rückstreugeometrie aufgenommen. Der Mb-Kristall wurde in einer Mutterlösung in einem Objektträger mit Vertiefung und einem Quarzdeckel untergebracht. Der Deckelrand wurde dann mit Klebstoff versiegelt. Der Objektträger wurde auf einem Goniometer so montiert, daß der Laserstrahl senkrecht auf die Fläche ($a \times b$) des Kristalls fiel. Die Kristallachsen wurden relativ zum $\vec{E}$ -Vektor des Laserstrahls nach dem folgenden Verfahren eingestellt.

2.2.3.2 Einstellung der Kristallachsen

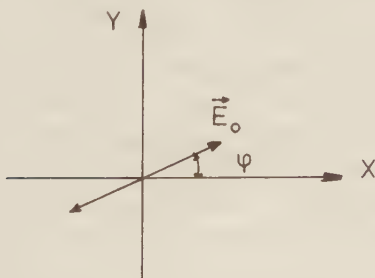
Entscheidend für Raman-Messungen an Mb-Kristallen ist die genaue Festlegung der Kristallachsen in bezug auf den $\vec{E}$ -Vektor der einfallenden polarisierten Strahlung. Wenn der $\vec{E}$ -Vektor des Laserstrahles nicht exakt parallel zur Kristallachse steht, so erzeugt der Kristall elliptisch polarisiertes Licht, das die Tensor-Bestimmung verfälscht. Deshalb wurden die Kristallachsen am Raman-Meßplatz wie folgt parallel zum $\vec{E}$ -Vektor des Laserstrahls eingestellt:

Zuerst wurden die Kristallachsen mit Hilfe eines Mikroskopes relativ zum Objektträger bestimmt (siehe II § 2.1.2.2.). Danach wurde der Kristall auf dem Goniometer montiert und die Kristallachsen wurden dann grob in bezug auf die experimentell festgelegte Streuebene justiert. Der $\vec{E}$ -Vektor des Laserstrahls wurde dann grob parallel zur Kristallachse eingestellt. Ein Teil des am Kristall unter 180° reflektierten Lichtes wurde verwendet, um den Analysator parallel zu diesem $\vec{E}$ -Vektor zu

stellen. Anschließend wurde die Raman-Intensität der Raman-Linie 1355 cm^{-1} bei Deoxy-Mb bzw. 1373 cm^{-1} bei Mb-CN bei Anregung mit der Laser-Linie 457.9 nm gemessen. Der $\vec{E}$ -Vektor des Laserstrahls wurde dann mit Hilfe des Polarisations-ebenenndrehers um einen kleinen Winkel (φ) gedreht (ca. $\pm 2^\circ$). Gleichzeitig wurde der Analysator um den gleichen Winkel gedreht und die Raman-Intensität wurde erneut gemessen. Für verschiedene Winkel (φ) wurde auf diese Weise die Raman-Intensität bestimmt.

Der $\vec{E}$ -Vektor ist dann exakt parallel zur Kristallachse, wenn ein Intensitätsextremum erscheint. Dies kann man theoretisch wie folgt begründen:

Nehmen wir an, daß der $\vec{E}$ -Vektor des Laserstrahles einen Winkel φ mit der Achse des Kristalls bildet.



Wir können ihn dann in zwei Komponenten zerlegen:

$$E_x = E_0 \cdot \cos \varphi$$

$$E_y = E_0 \cdot \sin \varphi$$

Es werden hier zwei Dipolmomente angeregt, nämlich

$$P_X = \beta_{XX} E_O \cos \varphi + \beta_{XY} E_O \sin \varphi$$

$$P_Y = \beta_{YX} E_O \cos \varphi + \beta_{YY} E_O \sin \varphi$$

Der Mb-Kristall besitzt zwei Reihen von Häm-molekülen ((1) und (2)), die durch ihre Symmetrie folgende Eigenschaften haben (siehe Anhang I):

$$\begin{aligned} \beta_{XX}^{(1)} &= \beta_{XX}^{(2)} , & \beta_{YY}^{(1)} &= \beta_{YY}^{(2)} \\ \beta_{XY}^{(1)} &= - \beta_{XY}^{(2)} , & \beta_{YX}^{(1)} &= - \beta_{YX}^{(2)} \end{aligned} \quad (\text{siehe I § 2.2.3})$$

Die Dipolmomente erzeugen Intensitäten I_X bzw. I_Y mit:

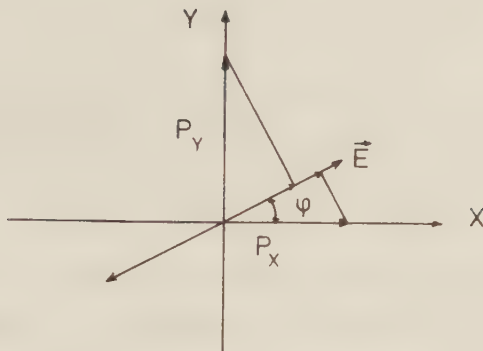
$$\begin{aligned} I_X \sim P_X^2 &= P_X^{(1)2} + P_X^{(2)2} = (\beta_{XX}^{(1)} E_O \cos \varphi + \beta_{XY}^{(1)} E_O \sin \varphi)^2 \\ &+ (\beta_{XX}^{(2)} E_O \cos \varphi + \beta_{XY}^{(2)} E_O \sin \varphi)^2 \quad \text{und} \\ I_Y \sim P_Y^2 &= P_Y^{(1)2} + P_Y^{(2)2} = (\beta_{YX}^{(1)} E_O \cos \varphi + \beta_{YY}^{(1)} E_O \sin \varphi)^2 \\ &+ (\beta_{YX}^{(2)} E_O \cos \varphi + \beta_{YY}^{(2)} E_O \sin \varphi)^2 . \end{aligned}$$

Mit Berücksichtigung der oben erwähnten Randbedingungen erhalten wir:

$$\begin{aligned} P_X^2 &= 2 E_O^2 (\beta_{XX}^2 \cos^2 \varphi + \beta_{XY}^2 \sin^2 \varphi) , \\ P_Y^2 &= 2 E_O^2 (\beta_{YX}^2 \cos^2 \varphi + \beta_{YY}^2 \sin^2 \varphi) . \end{aligned}$$

Wenn die Durchlaßrichtung des Polarisators parallel zum $\vec{E}_O$ -Vektor der einfallenden Laserstrahles steht, läßt er von den im Kristall induzierten Intensitäten I_X und I_Y folgenden Intensitätsanteil I durch:

$$I = P_X^2 \cos^2 \varphi + P_Y^2 \sin^2 \varphi$$



Setzen wir jetzt P_x^2 und P_y^2 ein, so erhalten wir:

$$I = 2 E_0^2 (\beta_{XX}^2 \cos^4 \varphi + \beta_{YY}^2 \sin^4 \varphi) + \\ 2 E_0^2 \sin^2 \varphi \cdot \cos^2 \varphi (\beta_{XY}^2 + \beta_{YX}^2)$$

Die Funktion hat ein Extremum für $\varphi = 0$ und $\varphi = 90^\circ$.

Abb. (13) zeigt die gemessene Intensität und die aus den im Minimum bestimmten Tensorkomponenten β_{XX} , β_{XY} , β_{YX} , β_{YY} berechnete Intensität für verschiedene Winkeleinstellungen (φ) zwischen dem $\vec{E}$ -Vektor und der Kristall-x-Achse für Mb-CN. Aus der Abbildung (13) erkennt man, daß der $\vec{E}$ -Vektor des einfallenden Laserlichtes genau dann parallel zur Kristall-x-Achse liegt, wenn er um einen Winkel von 5° relativ zur grob eingestellten Kristall-x-Achse gedreht wird. Die durchgezogene Linie ist die theoretisch berechnete Intensität. Die Übereinstimmung zwischen den experimentellen und den theoretischen Werten ist sehr gut.

2.2.3.3 Korrektur der gemessenen Intensitäten

Da der Mb-Kristall eine hohe Konzentration an Mb besitzt (ca. 0.05 Mol/l) (23) und dichroitisch absorbiert, müssen die Laser-Intensitäten I_0 ($\tilde{\nu}_L$) und die gemessenen Raman-Intensitäten I_{ML}^{obs} ($\tilde{\nu}_s$) bezüglich der Absorption korrigiert werden. Rechnen wir zuerst die Extinktion E für die vom Spekto-

meter erfaßte Kristalldicke $d = 0.0344$ cm (siehe Anhang II), Mb-Konzentration $C = 0.05$ Mol/l und einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon \approx 15$ (mMol cm) $^{-1}$ für die schwächer absorbierende Richtung.

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d \approx 15 \cdot 0.05 \cdot 10^3 \approx 25.3$$

D.h. $E \gg 1$. Wir könnten deshalb Gleichung / 34 / für diese Korrektur verwenden.

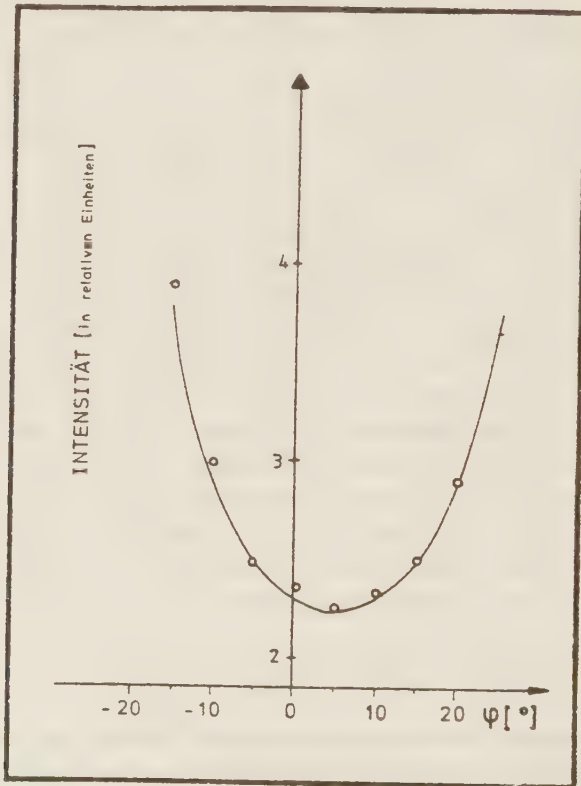


Abb. 13: Abhängigkeit der Ramanintensität I einer Ramanlinie des Mb-Kristallspektrums von dem Winkel φ zwischen dem E-Vektor des Laserstrahles und der Kristallachse. Die durchgezogene Kurve ist die theoretisch berechnete.

III. Die experimentellen Ergebnisse

1. Die optischen Absorptionsspektren

1.1. Absorptionsspektren der Lösungen

Die Spektren wurden aufgenommen, um die Konzentration der Stammlösung zu ermitteln und die Reinheit der Proben in bezug auf andere Mb-Derivate (Met-Mb) festzustellen. Der pH-Wert wurde zwischen 4 und 9 geändert. Die optischen Spektren der untersuchten Derivate zeigten innerhalb der Meßgenauigkeit keine pH-Abhängigkeit.

1.1.1. Deoxy-Mb

Abb. (14) zeigt das Absorptionsspektrum dieses Derivates im Bereich von 380 bis 650 nm. Die Soret-Bande liegt bei 435 nm, die β -Bande liegt bei 557 nm und die α -Bande erscheint als Schulter bei 580 nm. Der Extinktionskoeffizient bei 457 nm beträgt $11.8 \text{ (mMol}\cdot\text{cm)}^{-1}$ und bei 435 nm $115 \text{ (mMol}\cdot\text{cm)}^{-1}$.

1.1.2. Met-Mb-CN

Abb. (15) zeigt die Absorption dieses Derivates. Die Soret-Bande liegt hier bei 423 nm und der Extinktionskoeffizient beträgt hier $117 \text{ (mMol}\cdot\text{cm)}^{-1}$.

Die β -Bande liegt bei 542 nm und der Extinktionskoeffizient beträgt hier $10.7 \text{ (mMol}\cdot\text{cm)}^{-1}$. Die α -Bande erscheint hier ebenfalls als Schulter bei 480 nm.

1.1.3. Met-Hb-CN

Zur Ergänzung unserer Untersuchungen haben wir dieses Derivat verwendet. Abb. (16) zeigt sein Spektrum. Es ist dem Met-Mb-CN sehr ähnlich.

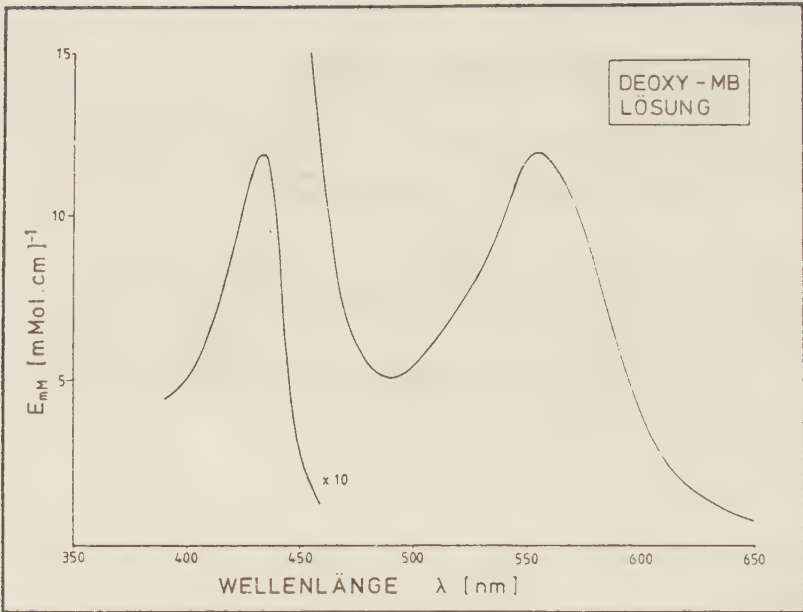


Abb. 14: Das Absorptionsspektrum des Deoxy-Mb in Lösung

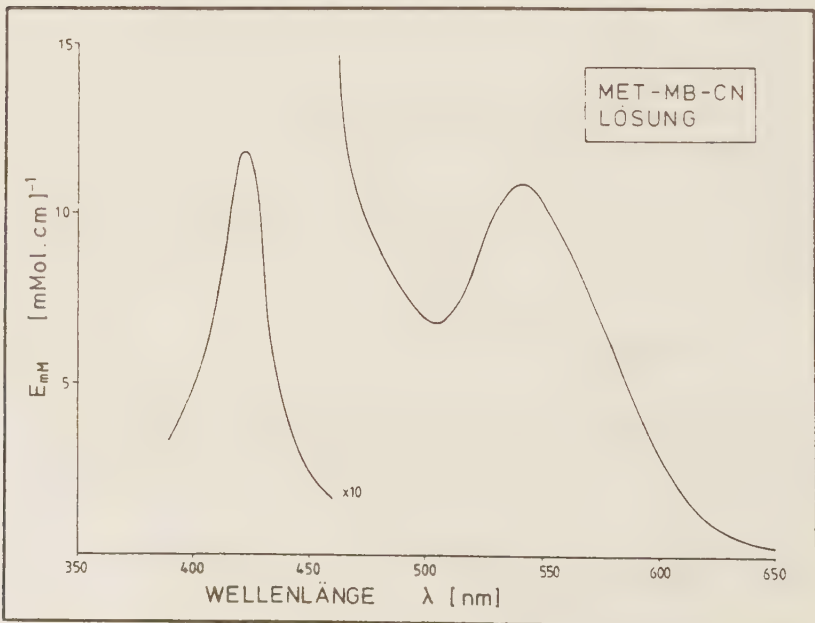


Abb. 15: Das Absorptionsspektrum des Met-Mb-CN in Lösung

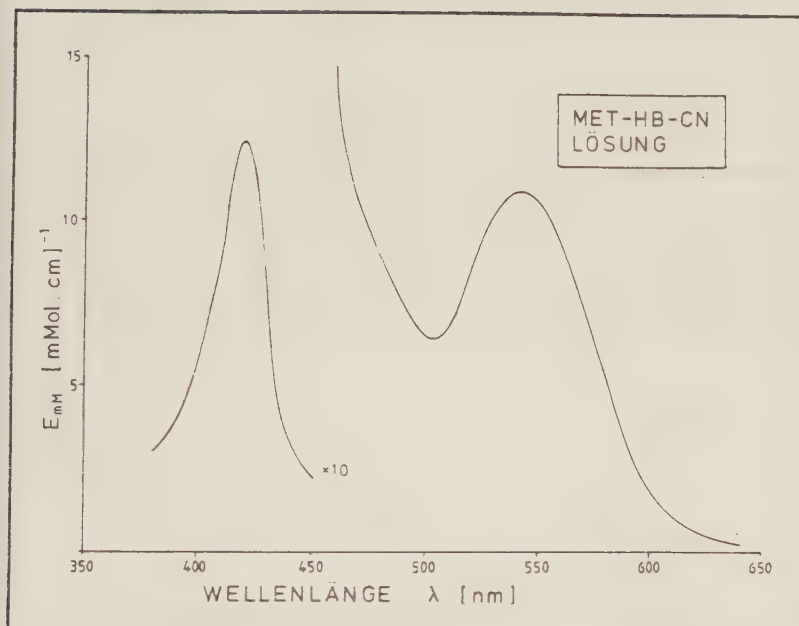


Abb. 16: Das Absorptionsspektrum des Met-Hb-CN in Lösung.

Die Soret-Bande liegt bei 420 nm und der Extinktionskoeffizient beträgt $124 \text{ (mMol}\cdot\text{cm)}^{-1}$. Die β -Bande liegt bei 542 nm. Ihr Extinktionskoeffizient beträgt $10.9 \text{ (mMol}\cdot\text{cm)}^{-1}$. Die α -Bande liegt bei 575 und erscheint als Schulter (Eaton et al. (28)).

1.2. Absorptionsspektren der Mb-Kristalle

Diese Spektren ähneln den entsprechenden Spektren der Lösungen. Die Bandenlage ist bis auf einen Fehler von $\pm 1 \text{ nm}$ in Kristall und Lösung gleich.

Die Kristallspektren wurden mit einem Leitz-Mikrophotometer (MP V 2) aus technischen Gründen nur im Bereich zwischen 430 und 700 nm aufgenommen.

1.2.1. Deoxy-Mb

Abb. (17a) zeigt die polarisierten Absorptionsspektren dieses Kristalls mit dem einfallenden Licht in Richtung c^* . Der $\vec{E}$ -Vektor des einfallenden Lichtstrahles ist parallel zur a -Achse bzw. zur b -Achse.

Der obere Teil dieser Abbildung stellt das Polarisationsverhältnis ϵ_b/ϵ_a dar.

Abb. (17b) zeigt das Spektrum für den Kristall mit der ausgeprägten (bxc)-Fläche. Hier ist der $\vec{E}$ -Vektor parallel zur b -Achse bzw. zur c -Achse. Die Einfallsrichtung liegt parallel zur a^* -Achse.

Die Polarisationsverhältnisse sind nicht, wie man es erwartet, konstant, sondern zeigen Schwankungen um einen Mittelwert, die bei 580 nm am größten sind.

1.2.2. Met-Mb-CN

Abb. (18a) zeigt das Spektrum eines MbCN-Kristalles mit ausgeprägter (axb)-Fläche. Der einfallende Lichtstrahl ist parallel zur c^* -Achse. Hier beobachtet man ebenfalls Schwankungen der Polarisationsverhältnisse.

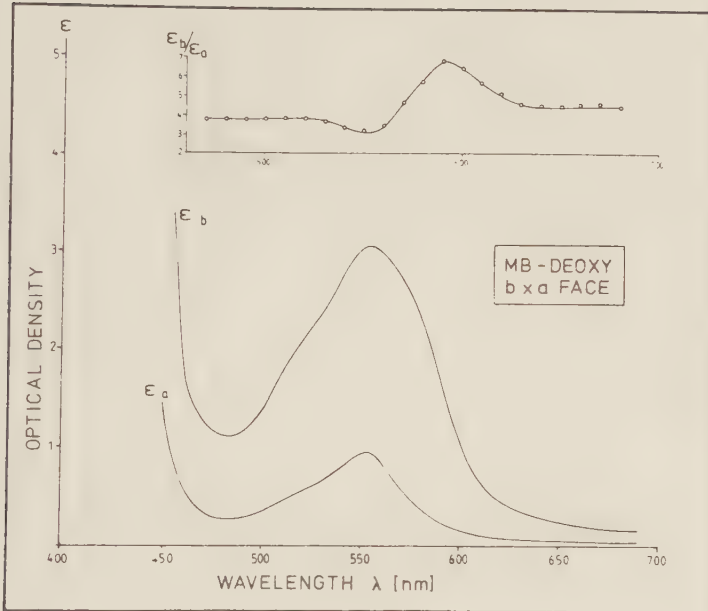


Abb. 17a: Das polarisierte Absorptionsspektrum des Deoxy-Mb-Kristalls mit ausgeprägter (bxa)-Fläche.

ϵ_a bzw. ϵ_b : ist die optische Dichte, wenn der $\vec{E}$ -Vektor des linear polarisierten Lichtes parallel zur a- bzw. b-Achse des Kristalls liegt.

ϵ_b / ϵ_a : ist das Polarisationsverhältnis.

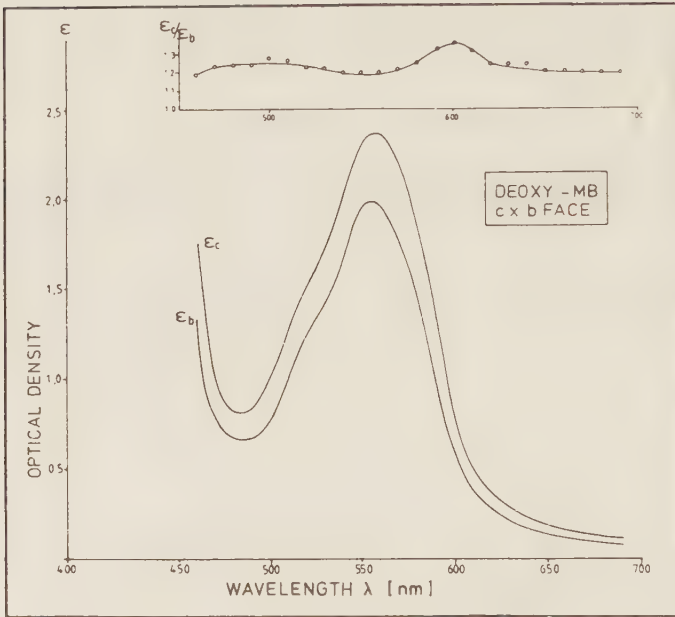


Abb. 17b: Das polarisierte Absorptionsspektrum des Deoxy-Mb-Kristalls mit ausgeprägter (cxb)-Fläche.

ϵ_c bzw. ϵ_b : ist die optische Dichte, wenn der $\vec{E}$ -Vektor des linear polarisierten Lichtes parallel zur c- bzw. b-Achse des Kristalls liegt.

ϵ_c / ϵ_b : ist das Polarisationsverhältnis.

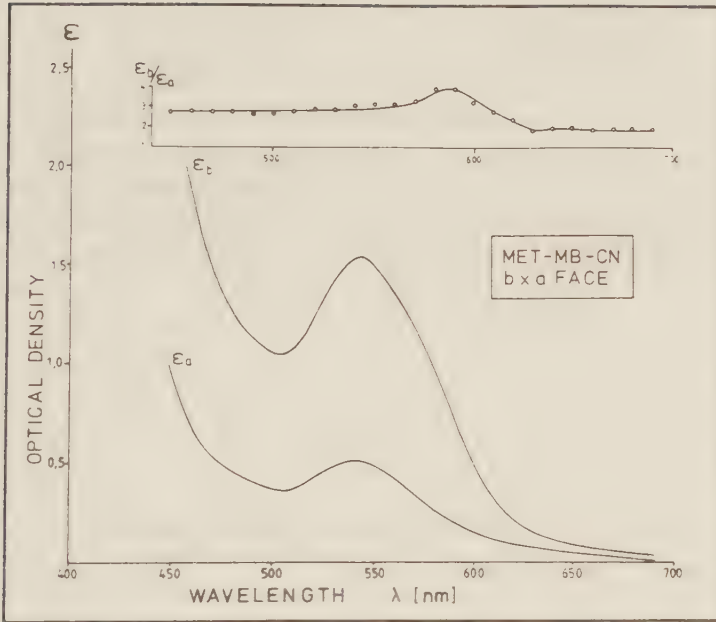


Abb. 18a: Das polarisierte Absorptionsspektrum des Met-Mb-CN-Kristalls mit ausgeprägter (bxa)-Fläche.

ϵ_a bzw. ϵ_b : ist die optische Dichte, wenn der $\vec{E}$ -Vektor des linear polarisierten Lichtes parallel zur a- bzw. b-Achse des Kristalls liegt.

ϵ_b / ϵ_a : ist das Polarisationsverhältnis.

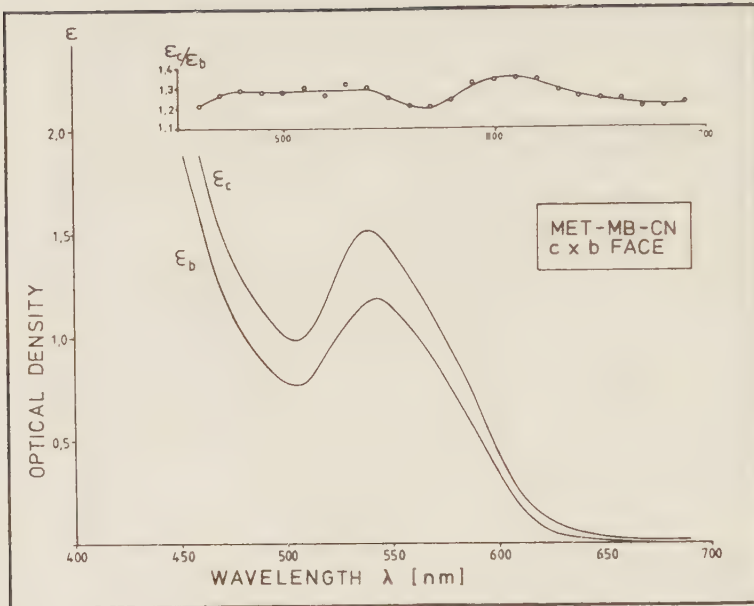


Abb. 18b: Das polarisierte Absorptionsspektrum des Met-Mb-CN-Kristalls mit ausgeprägter (cxb)-Fläche.

ϵ_c bzw. ϵ_b : ist die optische Dichte, wenn der $\vec{E}$ -Vektor des linear polarisierten Lichtes parallel zur c- bzw. b-Achse des Kristalls liegt.

ϵ_c/ϵ_b : ist das Polarisationsverhältnis.

Abb. (18b) zeigt das Spektrum für den Mb-CN-Kristall mit ausgeprägter (bxc)-Fläche. Der einfallende Lichtstrahl ist hier parallel zur a-Achse, die Polarisationsrichtung des Lichtes ist parallel zur b- bzw. c-Achse.

2. Die Raman-Spektren

2.1. Raman-Spektren von Mb- und Hb-Derivaten in Lösungen

Die Raman-Spektren der Mb- und Hb-Lösungen wurden für verschiedene pH-Werte im Bereich von 4 bis 9 gemessen. Weder die Dispersionskurven des Depolarisationsgrades noch die Intensitätsprofile der untersuchten Derivate zeigten eine pH-Abhängigkeit (siehe Kapitel V). Dies erfüllt eine der gestellten Anforderungen an diese Meßmethode (siehe I § 2.1.2).

2.1.1. Deoxy-Mb

2.1.1.1 Raman-Spektren im Bereich zwischen 1300 und 1700 cm^{-1}

Abb. (19) zeigt dieses Spektrum. Es wurde mit der Laser-Linie 457.9 nm angeregt (präresonanter Bereich der Soret-Bande). Solche Raman-Spektren wurden von vielen Autoren analysiert, Strekas et al. (42), Brunner et al. (43), Spiro and Strekas (44).

Im folgenden beschreiben wir die in dieser Arbeit untersuchten Raman-Linien.

Ogoshi et al. (45), Abe et al. (46) ermittelten die Normalschwingungen der Raman-Linien für Nickel-Okta-Ethyl-Porphyrin (Ni(OEP)) mit Hilfe der Normalkoordinaten-Analyse. Ihre Ergebnisse lassen sich auf das Hämolekül übertragen. Wir erhalten folgendes:

Die Raman-Linie 1355 cm^{-1} des Deoxy-Mb-Spektrums entspricht der Raman-Linie 1383 cm^{-1} des Ni (OEP)-Spektrums. Diese Raman-Linie hängt vom Oxidationszustand des Eisenatoms des Hämoleküls und von der Ligandenart ab. Ihre Normalschwingung setzt sich zusammen aus den Schwingungen der vier Pyrrolringe, die in Phase in der Hämebene längs der Verbindungslinie $\text{Fe-N}_{\text{Pyrrol}}$ schwingen

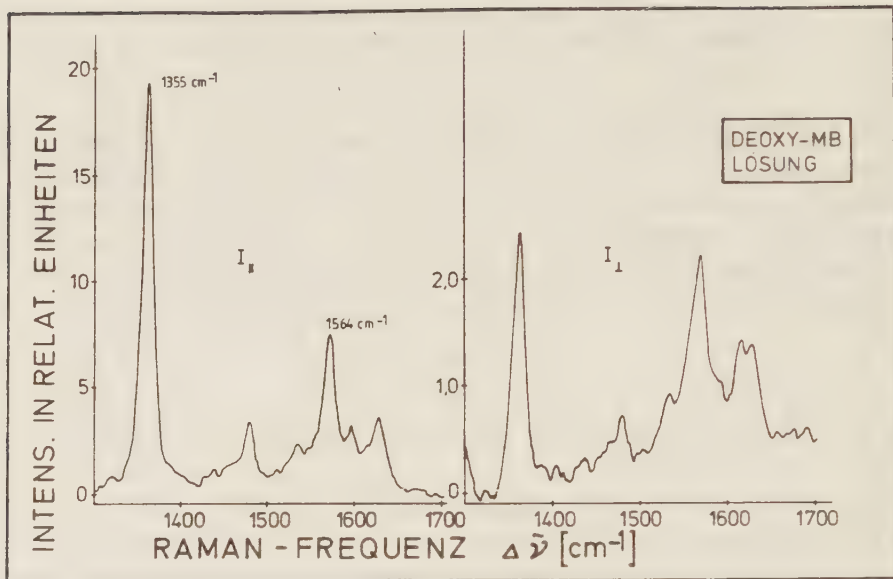


Abb. 19: Das Raman-Spektrum des Deoxy-Mb in Lösung im Frequenzbereich zwischen 1300 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} .

$I_{||}$, $I_{\perp}$: sind die beobachteten Raman-Intensitäten, wenn die Durchlaßrichtung des Polarisators parallel bzw. senkrecht zum E-Vektor des Laserstrahles liegt.

Aufnahmebedingungen: Aufnahmegeschwindigkeit = $0.5 \text{ cm}^{-1}/\text{s}$,
 Integrationszeit = 3 s, Spaltbreite = $250 \mu\text{m}$, Ausgangsleistung des Lasers = 500 mW, Laserlinie = 457.9 nm,
 Mb-Konzentration = $7,5 \times 10^{-5} \text{ Mol/l}$.

und aus Streckschwingungen der C-N-Atome (Abb. (20a)). Die Normalschwingung dieser Linie transformiert sich in D_{4h} -Symmetrie wie A_{1g} .

Die Raman-Linie 1564 cm^{-1} des Deoxy-Mb-Spektrums entspricht der Raman-Linie 1603 cm^{-1} des Ni (OEP)-Spektrums. Ihre Normalschwingung transformiert sich wie A_{2g} in der D_{4h} -Symmetrie (45,46) und setzt sich zusammen aus den Streckschwingungen $C_\alpha - C_m$ und $C_\alpha - C_\beta$. C_m -H-Schwingungen tragen hier zur Gesamtschwingung bei (Abb. (20b)).

Die Frequenz dieser Raman-Linie hängt vom Spinzustand des Eisenatoms ab.

In dieser Arbeit wurden die oben erwähnten Raman-Linien untersucht, weil sie zwei verschiedene Schwingungsmoden darstellen und ihre Intensitäten so stark sind, daß der Meßfehler hinreichend klein ist.

2.1.1.2. Intensitätsprofile und Dispersionskurven des Depolarisationsgrades

a) Raman-Linie 1355 cm^{-1}

Abb. (21) zeigt die Dispersionskurven des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu}_L)$. $\rho(\tilde{\nu}_L)$ variiert in diesem Meßbereich zwischen 0.13 und 0.21.

Abb. (21) zeigt gleichzeitig die Intensitätsprofile dieser Linie. Sie zeigen einen starken Anstieg zur Soret-Bande.

b) Raman-Linie 1564 cm^{-1}

Abb. (22) zeigt die Dispersionskurve $\rho(\tilde{\nu}_L)$ dieser Linie. Aus $\rho(\tilde{\nu}_L)$ kann man feststellen, daß diese Linie invers polarisiert ist.

Abb. (22) zeigt die Intensitätsprofile dieser Linie. Sie zeigen einen Anstieg zu den Soret- und α -Banden.

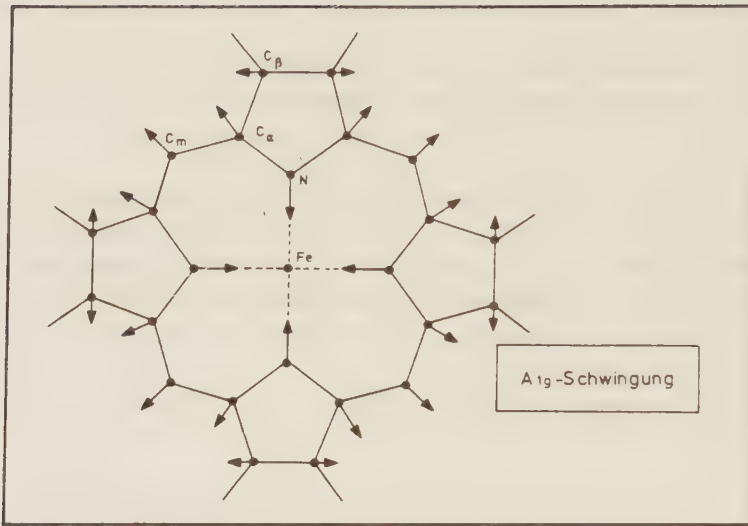


Abb. 20 a: Die A_{1g} -Normalschwingung der Raman-Linie 1383 cm^{-1} des Ni (OEP) (Abe et al. (46)).

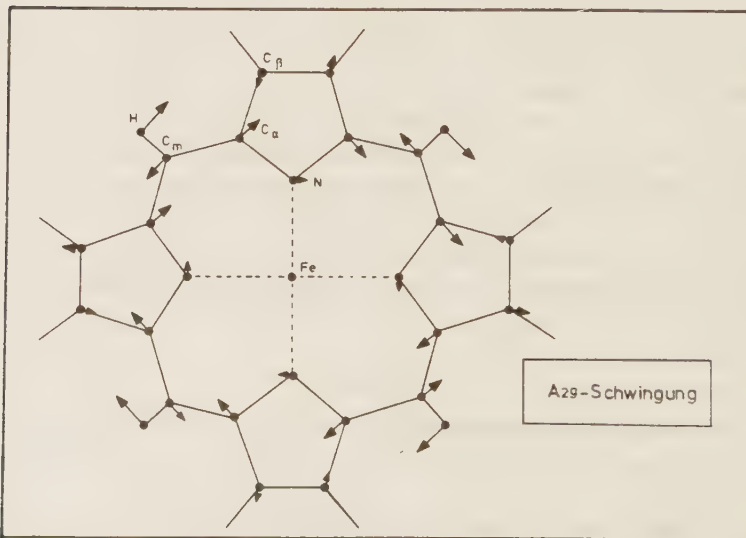
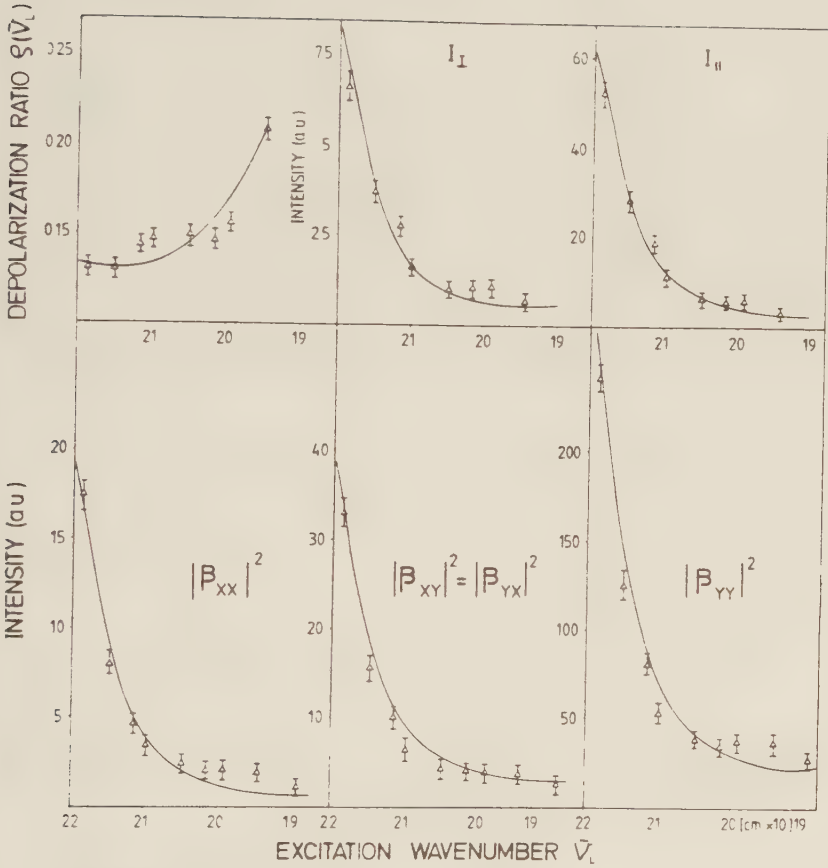


Abb. 20 b: Die A_{2g} -Normalschwingung der Raman-Linie 1603 cm^{-1} des Ni (OEP) (Abe et al. (46)).



MB-DEOXY: $\tilde{\nu} = 1355 \text{ cm}^{-1}$

Abb. 21: Dispersionskurve des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu}_L)$ und die Intensitätsprofile ($I_\parallel$, $I_\perp$) der Raman-Linie 1355 cm^{-1} des Deoxy-Mb-Spektrums in Lösung (oberer Teil) und die Intensitätsprofile des Deoxy-Mb-Kristalls (unterer Teil). Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse des Computerfits.

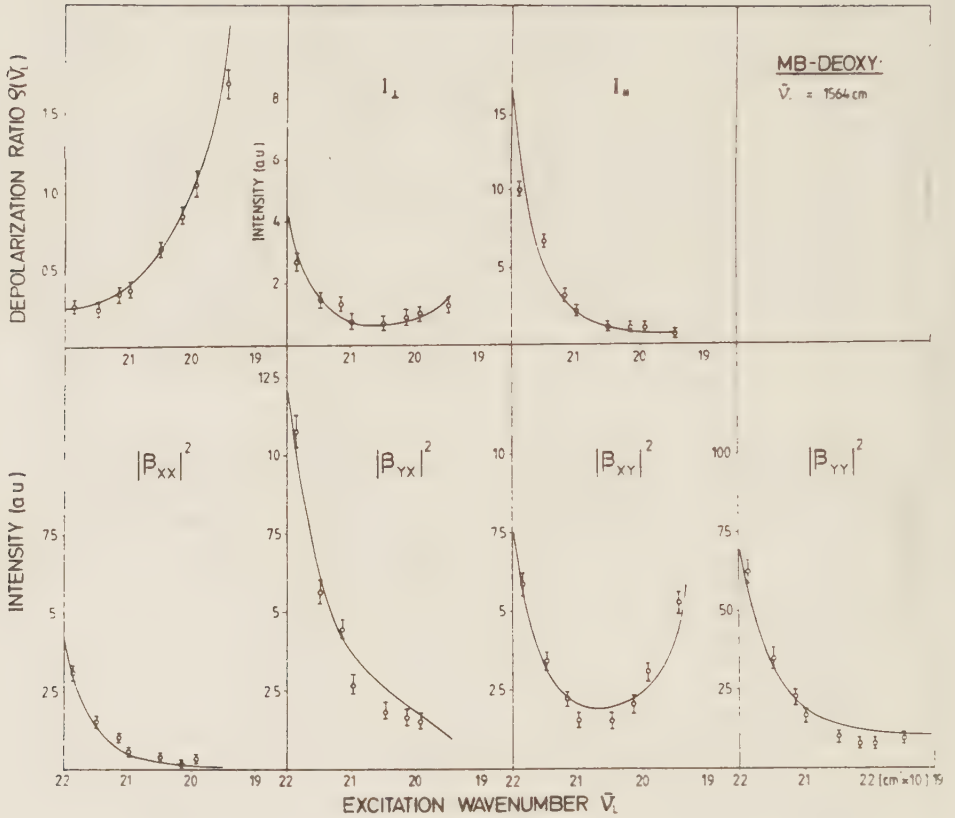


Abb. 22: Dispersionskurve des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu}_L)$ und die Intensitätsprofile ($I_{\parallel}$, $I_{\perp}$) der Raman-Linie 1564 cm^{-1} des Deoxy-Mb-Spektrums in Lösung (oberer Teil) und die Intensitätsprofile des Deoxy-Mb-Kristalls (unterer Teil). Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse des Computerfits.

2.1.2. Met-Mb-CN

2.1.2.1. Ramanspektrum zwischen 1300 und 1700 cm^{-1}

Abb. (23) zeigt dieses Spektrum. Hier verschiebt sich die Oxidationsmarker-Raman-Linie von 1355 cm^{-1} um 18 cm^{-1} auf 1373 cm^{-1} . Die Spinmarker-Raman-Linie verschiebt sich ebenfalls von 1564 cm^{-1} um 16 cm^{-1} auf 1580 cm^{-1} . Die Ursachen dieser Verschiebungen sind die Änderungen im Oxidationszustand von Fe^{2+} auf Fe^{3+} und im Spinzustand von $s = 2$ auf $s = \frac{1}{2}$ des Eisenatoms beim Übergang von Deoxy-Mb zum Met-Mb-CN.

2.1.2.2. Intensitätsprofile und Dispersionskurven des Depolarisationsgrades

a) Raman-Linie 1373 cm^{-1}

Abb. (24) zeigt die Dispersionskurven des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu}_L)$ dieser Raman-Linie. Hier zeigt $\rho(\tilde{\nu}_L)$ einen ähnlichen Verlauf, wie bei der entsprechenden Raman-Linie im Deoxy-Mb.

Abb. (24) zeigt die entsprechenden Intensitätsprofile. Sie sind ebenfalls denen des Deox-Mb ähnlich.

b) Raman-Linie 1580 cm^{-1}

Abb. (25) stellt die Dispersionskurven $\rho(\tilde{\nu}_L)$ und die Intensitätsprofile(IP) dieser Linie dar. Die Ähnlichkeit mit der entsprechenden Linie des Deoxy-Mb ist hier sehr groß.

2.1.3. Met-Hb-CN

2.1.3.1. Raman-Spektrum zwischen 1300 und 1700 cm^{-1}

Abb. (26) stellt dieses Spektrum dar. Met-Hb-CN hat das gleiche Raman-Spektrum wie Met-Mb-CN.

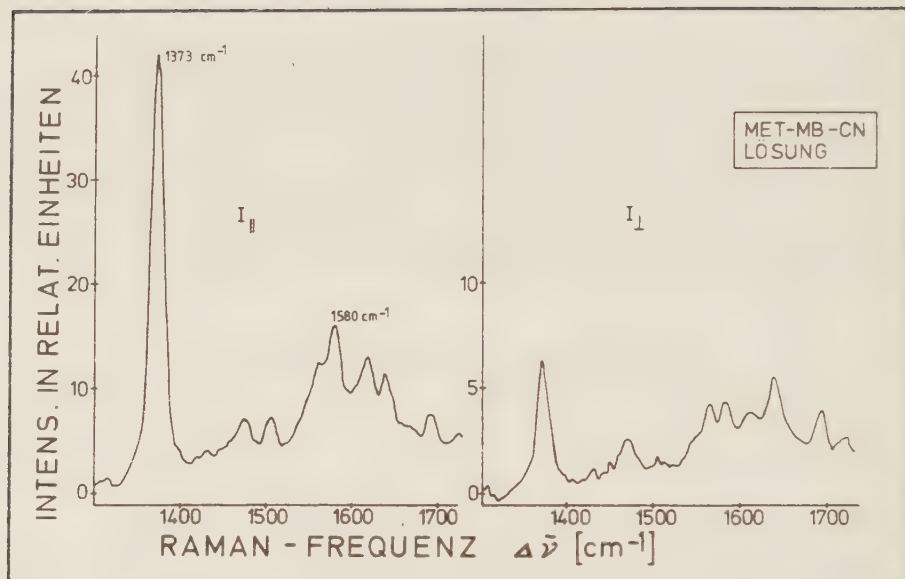
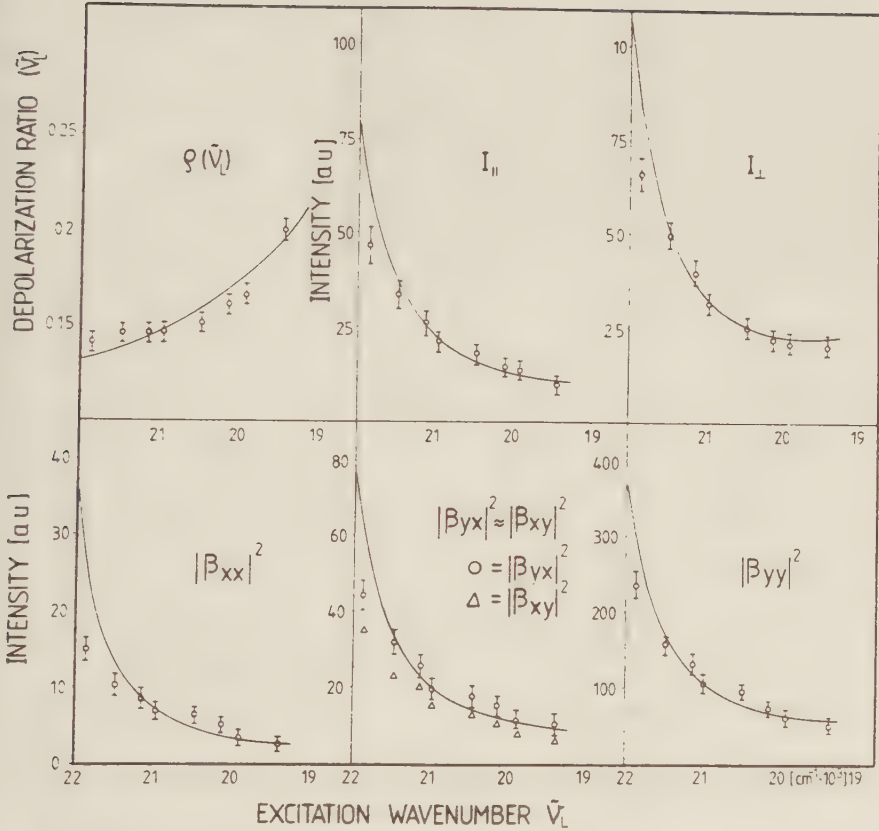


Abb. 23: Das Raman-Spektrum des Met-Mb-CN in Lösung im Frequenzbereich zwischen 1300 cm^{-1} und 1700 cm^{-1}

$I_{\parallel}$, $I_{\perp}$: sind die beobachteten Raman-Intensitäten, wenn die Durchlaßrichtung des Polarisators parallel bzw. senkrecht zum $\vec{E}$ -Vektor des Laserstrahles liegt.

Aufnahmebedingungen: wie in Abb.(19), mit Ausnahme der Konzentration $c = 4,6 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$

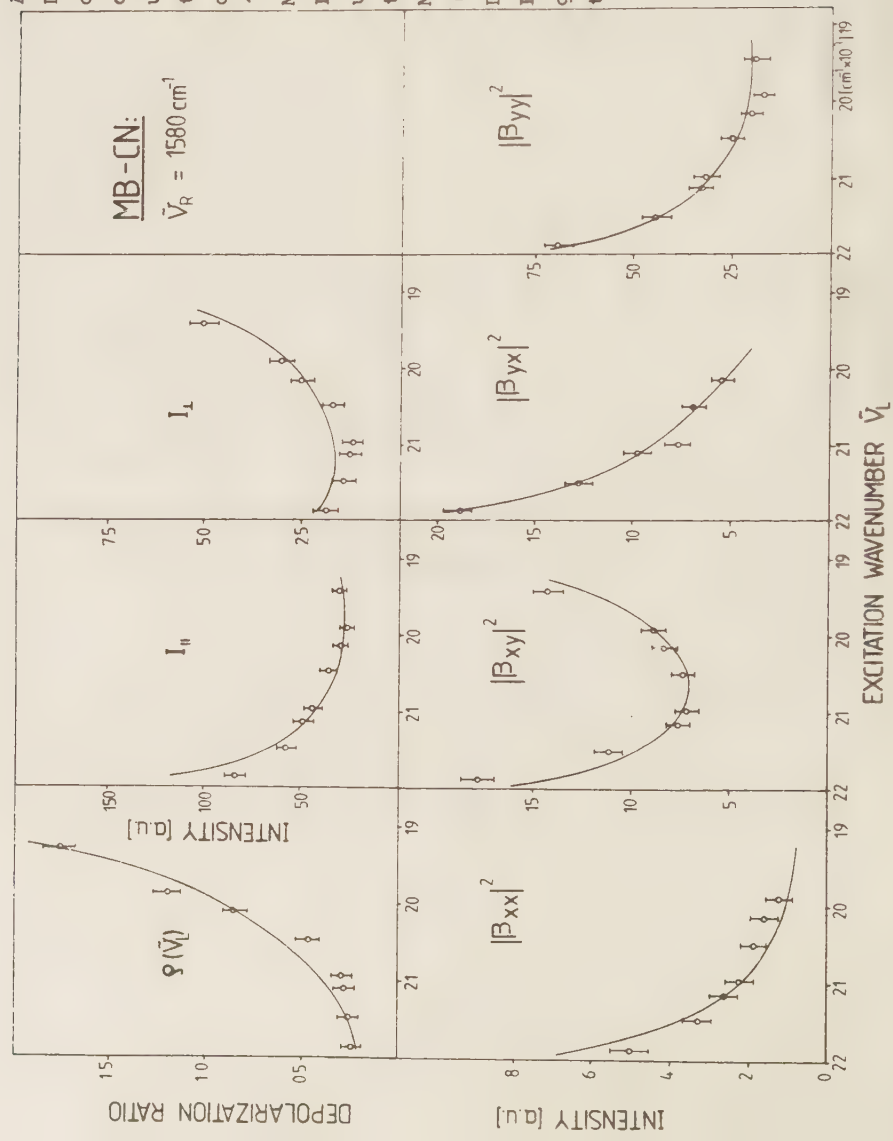


MB-CN: $\tilde{\nu}_R = 1373 \text{ cm}^{-1}$

Abb. 24: Dispersionskurve des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu}_L)$ und die Intensitätsprofile ($I_{||}$, $I_{\perp}$) der Raman-Linie 1373 cm^{-1} des Met-Mb-CN-Spektrums in Lösung (oberer Teil) und die Intensitätsprofile des Met-Mb-CN-Kristalls (unterer Teil). Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse des Computerfits.

Abb. 25:

Dispersionskurve
des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu}_L)$
und die Intensitätsprofile ($I_{\parallel}, I_{\perp}$)
der Raman-Linie
1580 cm^{-1} des Met-Mb-CN-Spektrums in
Lösung (oberer Teil)
und die Intensitätsprofile des
Met-Mb-CN-Kristalls
(unterer Teil).
Die durchgezogenen
Linien sind die Ergebnisse des Computerts.



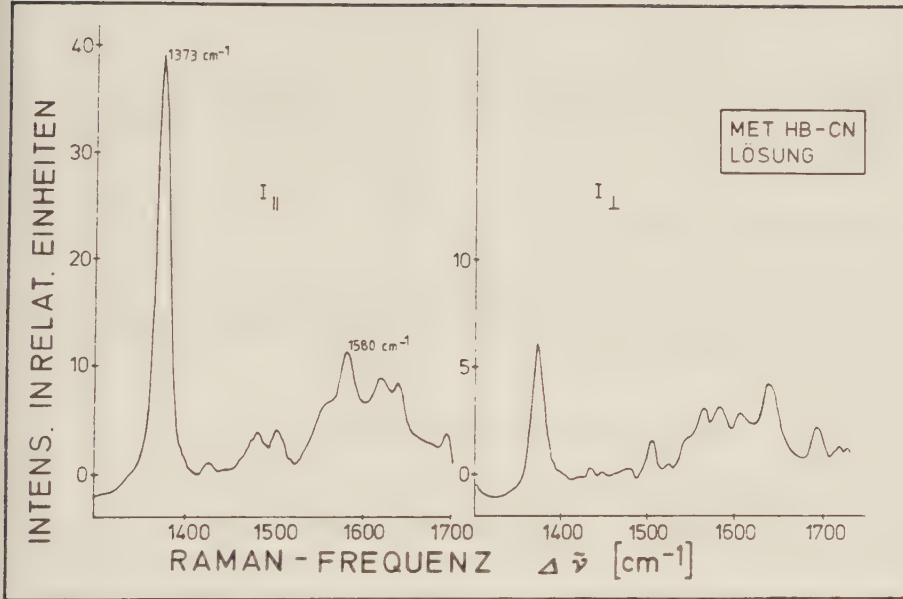


Abb. 26: Das Ramanspektrum des Met-Hb-CN in Lösung im Frequenzbereich zwischen 1300 cm^{-1} und 1700 cm^{-1}

$I_{||}$, $I_{\perp}$: sind die beobachteten Raman-Intensitäten, wenn die Durchlaßrichtung des Polarisators parallel bzw. senkrecht zum $\vec{E}$ -Vektor des Laserstrahles liegt.

Aufnahmebedingungen: wie in Abb. (19), mit Ausnahme der Konzentration $c = 4,5 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$

2.1.3.2. Intensitätsprofile und Dispersionskurven des Depolarisationsgrades

a) Raman-Linie 1373 cm^{-1}

Abb. (27) zeigt die Dispersionskurve des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu}_L)$ und die Intensitätsprofile(IP) dieser Raman-Linie.

b) Raman-Linie 1580 cm^{-1}

Die Dispersionskurve des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu}_L)$ und die Intensitätsprofile(IP) dieser Raman-Linie sind ebenfalls in Abb. (27) dargestellt.

2.2. Raman-Spektren der Mb-Kristalle

Die Raman-Spektren der Mb-Kristalle sind qualitativ besser als die in Lösung. Das Verhältnis von Raman-Signal zu Rayleigh-Streuung und der Fluoreszenz ist hier viel größer, da die Mb-Kristalle reiner als das Mb in Lösung sind und höhere Mb-Konzentration, $\approx 0.05 \text{ Mol/l}$, besitzen. Dies ermöglicht die Messung mit geringerer Laser-Leistung, $\approx 20 \text{ mW}$, und somit kann man ab 10 cm^{-1} Raman-Linien auflösen.

2.2.1. Deoxy-Mb

2.2.1.1. Raman-Spektrum im Bereich von 0 bis 1700 cm^{-1}

Abb. (28) zeigt das unpolarisierte Mb-deoxy-Raman-Spektrum. Dies ermöglicht einen Vergleich mit dem der Mb-deoxy-Lösung. Interessant ist hier der Bereich in der Nähe der Rayleigh-Linie.

Die Spektren in Lösung und im Kristall sind innerhalb des Meßfehlers $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ identisch.

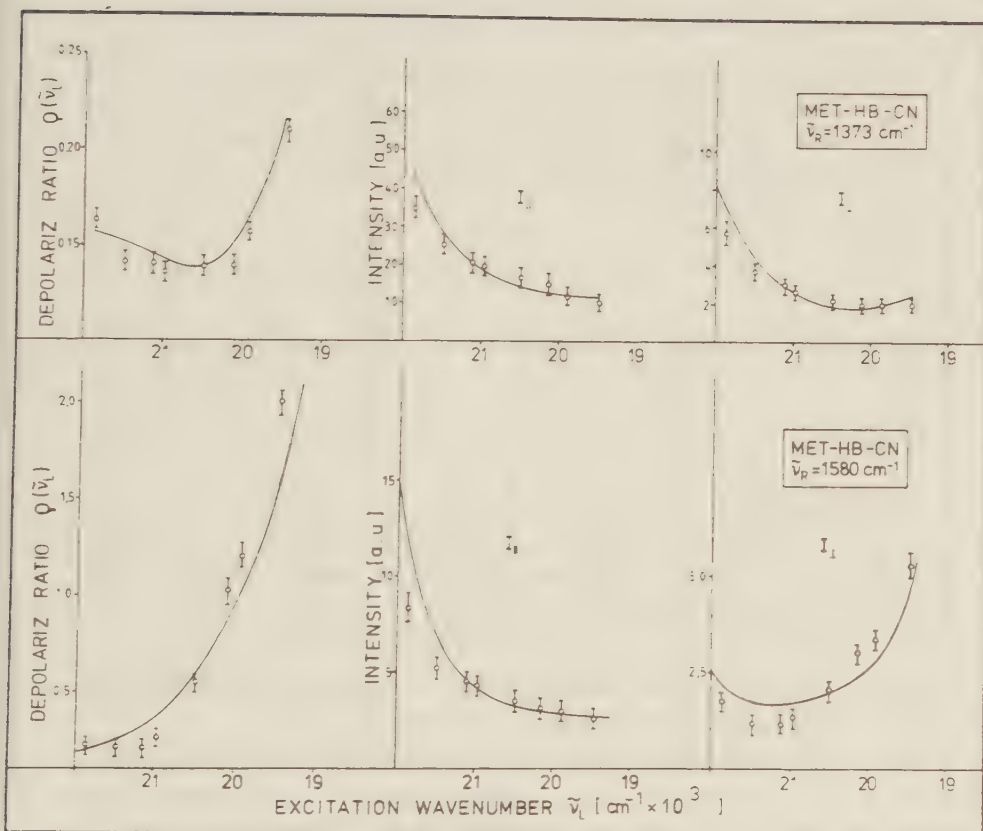


Abb. 27: Dispersionskurven des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu}_L)$ und die Intensitätsprofile ($I_{||}$, $I_{\perp}$) des Met-Hb-CN in Lösung für die Raman-Linien 1373 cm^{-1} (oben) und 1580 cm^{-1} (unten). Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse des Computer-fits.

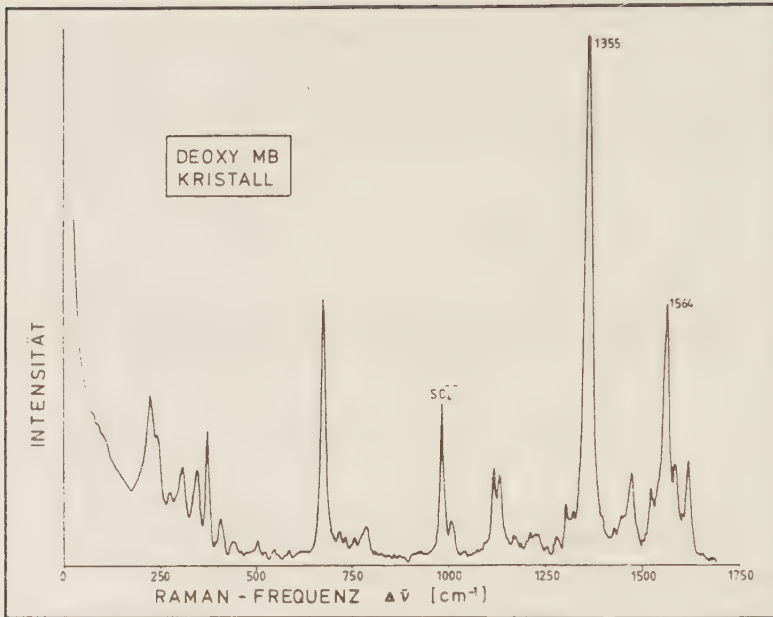


Abb. 28: Das Raman-Spektrum des Deoxy-Mb-Kristalls im Frequenzbereich zwischen 0 cm⁻¹ und 1700 cm⁻¹.

Aufnahmebedingungen: 180° Streugeometrie (nicht polarisiert, Kristall mit ausgeprägter (axb)-Fläche), Laserleistung = 100 mW (an der Kristalloberfläche ≈ 40 mW), Spaltbreite = 250 μm, Aufnahmegeschwindigkeit = 0.5 cm⁻¹/s, Integrationszeit = 3 s, Laserlinie = 457,9 nm.

2.2.1.2. Raman-Spektren im Bereich von 1300 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} mit verschiedenen Polarisationen

Abb. (29) zeigt die vier möglichen Raman-Spektren des Deoxy-Mb-Kristalls mit ausgeprägter (axb)-Fläche. Hier kann man den Unterschied zwischen den einzelnen Intensitäten feststellen. Diese Spektren sollen die gesamten Kristallspektren repräsentieren.

2.2.1.3. Die Intensitätsprofile

Es wurden hier ebenfalls die Raman-Linien 1355 cm^{-1} und 1564 cm^{-1} ausgewertet.

a) Raman-Linie 1355 cm^{-1}

Abb. (21) zeigt die vier Intensitätsprofile dieser Linie. Sie wurden nach Gleichung / 35 / in die Tensorkomponenten

$|\beta_{xx}|^2$, $|\beta_{xy}|^2$, $|\beta_{yx}|^2$ und $|\beta_{yy}|^2$ umgeschrieben.

Hier sieht man, daß $|\beta_{yy}|^2$ um eine Größenordnung größer als die anderen Tensorkomponenten ist und $|\beta_{xy}|^2 = |\beta_{yx}|^2$ ist. Alle Intensitäten steigen zur Soret-Bande hin an.

b) Raman-Linie 1564 cm^{-1}

Abb. (22) stellt die Intensitätsprofile dieser Linie dar.

Hier bleibt $|\beta_{yy}|^2$ größer als die anderen Komponenten. $|\beta_{xy}|^2$ und $|\beta_{yx}|^2$ verhalten sich ganz unterschiedlich. Sie sind von der Resonanz der α - und β -Bande beeinflusst.

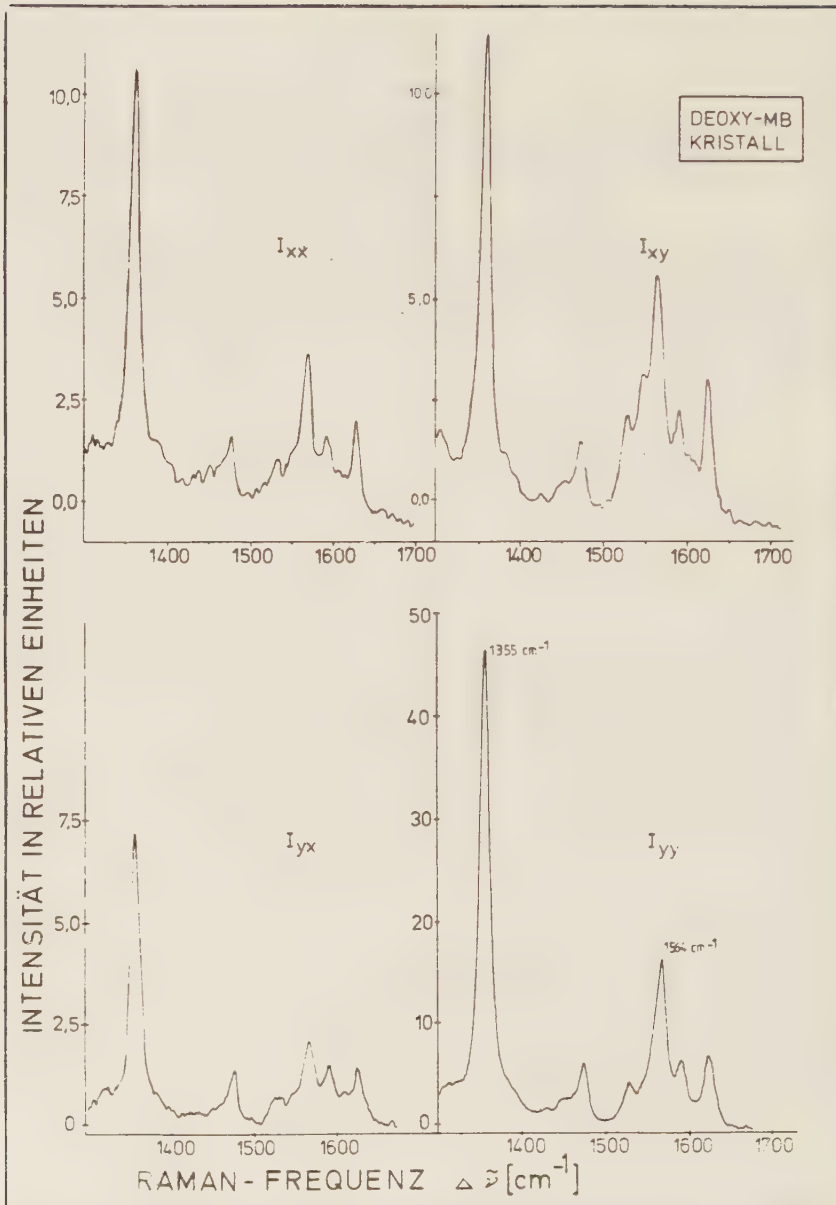


Abb. 29: Die vier Raman-Intensitäten des Deoxy-Mb-Kristalls im Frequenzbereich zwischen 1300 und 1700 cm⁻¹ angeregt mit der Laserlinie 457,9 nm.
Aufnahmebedingungen: (wie in Abb. (28) mit Ausnahme der Polarisation).

2.2.2. Met-Mb-CN

2.2.2.1. Raman-Spektrum im Bereich zwischen 0 und 1700 cm^{-1}

Abb. (30) zeigt das unpolarisierte Met-Mb-CN-Spektrum. Ein Unterschied zwischen dem Lösungs- und dem Kristallspektrum des Derivates konnte nicht festgestellt werden.

2.2.2.2. Raman-Spektrum im Bereich zwischen 1300 und 1700 cm^{-1} mit verschiedenen Polarisationen

Abb. (31) stellt die vier möglichen Intensitäten dar. Die Raman-Linien 1373 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} wurden ausgewertet.

2.2.2.3. Die Intensitätsprofile

a) Raman-Linie 1373 cm^{-1}

Abb. (24) zeigt die Intensitätsprofile dieser Linie. Ihr Verlauf ähnelt der des Deoxy-Mb. Hier ist aber $\beta_{XY} \neq \beta_{YX}$.

b) Raman-Linie 1580 cm^{-1}

Abb. (25) stellt die Intensitätsprofile dieser Linie dar. Sie ähneln der des Deoxy-Mb.

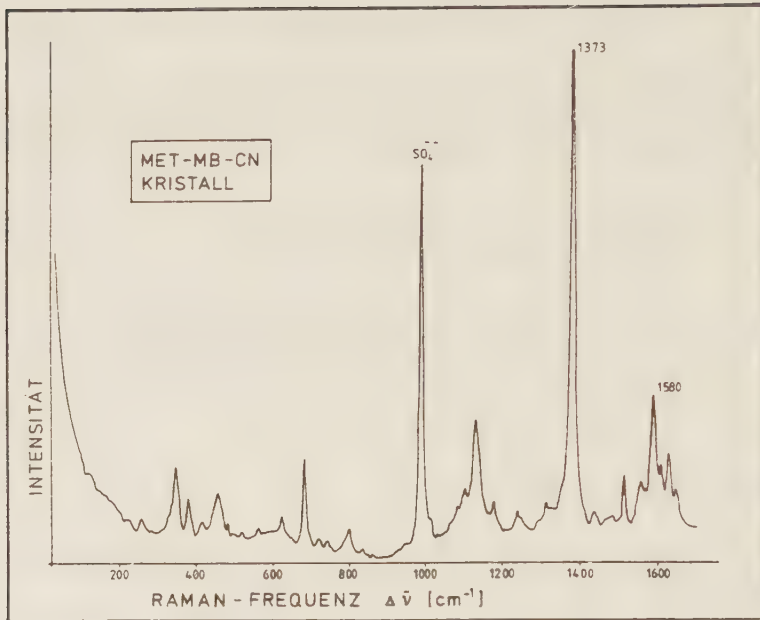


Abb. 30: Das Raman-Spektrum des Met-Mb-CN-Kristalls im Frequenzbereich zwischen 0 und 1700 cm⁻¹. Aufnahmebedingungen: wie in Abb. (28)

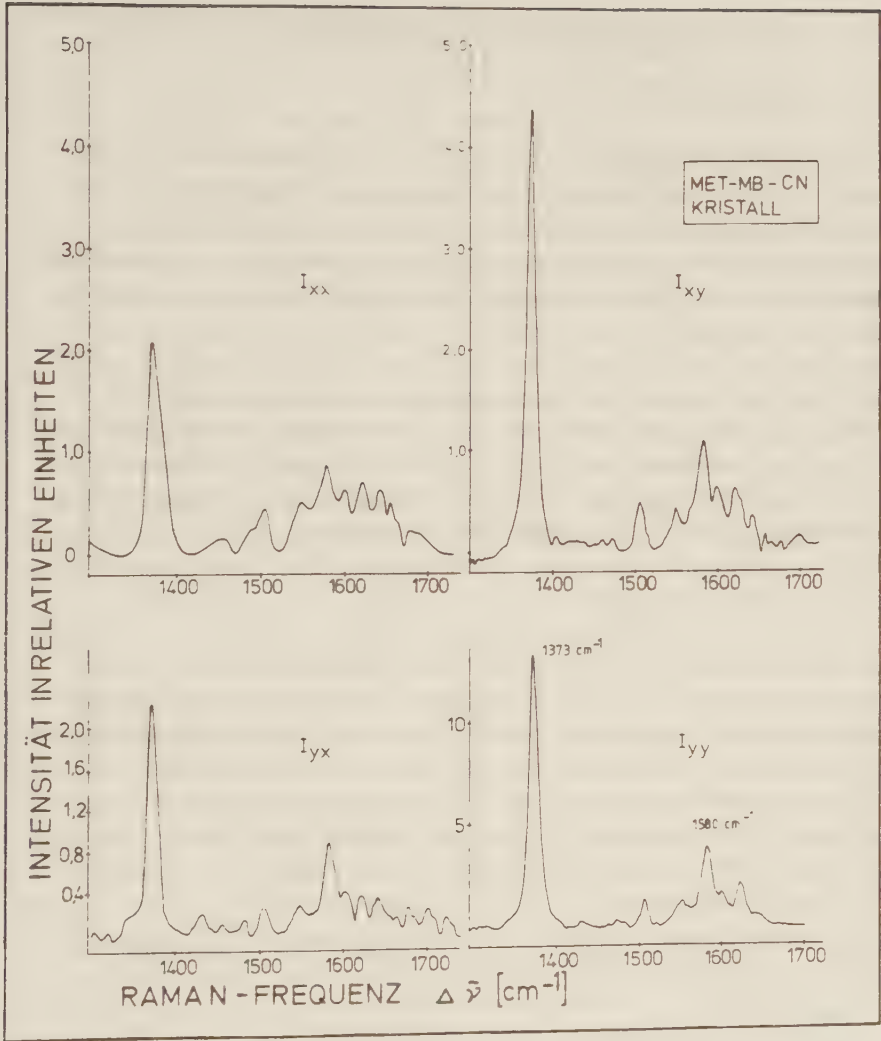


Abb. 31: Die vier Raman-Intensitäten des Met-Mb-CN-Kristalls im Frequenzbereich zwischen 1300 und 1700 cm⁻¹ angeregt mit der Laserlinie 457,9 nm.
Aufnahmebedingungen: wie in Abb. (28) mit Ausnahme der Polarisation.

IV. Fitverfahren und Auswertung der experimentellen Daten

1. Das Fitprogramm

Durch dieses Fitprogramm soll der Raman-Streutensor im Molekülsystem bestimmt werden. Dies geschieht, indem wir die Dispersionskurven des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu}_L)$ und die Intensitätsprofile IP mit Hilfe eines Computerfits theoretisch berechnen und mit den experimentellen vergleichen bis eine Übereinstimmung stattfindet.

Das Fitprogramm ist ein Minimierungs-Computerprogramm der CERN-Bibliothek. Es verwendet drei unterschiedliche Minimierungsprogramme, um die lokalen Minima der korrespondierenden χ^2 -Funktion zu suchen. Eine ausführliche Beschreibung dieses Programmes ist bei Schweitzer (35) dargestellt.

2. Das Fitverfahren

Die Fitparameter $\alpha_{e,s}^r$ sollen durch dieses Fitverfahren ermittelt werden. Sie sind in Gleichung / 30 / eingeführt und beschreiben den Raman-Streutensor im Molekülsystem vollständig. $\alpha_{e,s}^r$ werden erhalten, indem man die Dispersionskurve $\rho(\tilde{\nu}_L)$ des Depolarisationsgrades und die Intensitätsprofile der Mb-Derivate in den Lösungen und in den Kristallen fittet. Die praktische Durchführung dieses Verfahrens können wir wie folgt zusammenfassen:

- 1) Die drei Tensorinvarianten β^s , γ^2 und β^a in Gleichung / 18 / wurden mit Hilfe der Gleichungen / 30 /, / 27 / und / 26 / ausgerechnet.
- 2) Die so erhaltenen Tensorinvarianten wurden dann in Gleichung / 19 / eingesetzt. Dadurch wurden die Intensitätsprofile $I_{||}$, $I_{\perp}$ und der Depolarisationsgrad $\rho(\tilde{\nu}_L)$ theoretisch bestimmt.
- 3) Der Streutensor $\hat{\beta}$ im Molekülsystem wurde ins Kristallsystem gemäß Gleichung / 30a / transformiert. Die Intensitätsprofile der Mb-Kristalle wurden dann gemäß Gleichung / 32 / ausgerechnet.

- 4) Die gemessenen Dispersionskurven des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu}_L)$ wurden dann mit Hilfe des Fitprogrammes an die in 2) theoretisch ausgerechnete Dispersionskurve $\rho(\tilde{\nu}_L)$ angepaßt. Dadurch bekommen wir einen Satz von Fitparametern $\alpha_{e,s}^r$ die den Raman-Streutensor im Molekülsystem vollständig beschreiben.
- 5) Die Intensitätsprofile $I_{||}$ und $I_{\perp}$ der Mb-Derivate in Lösungen wurden dann mit Hilfe des erhaltenen Fitparametersatzes ausgerechnet und mit dem experimentellen verglichen. Dieses Verfahren wurde so lange wiederholt, bis alle experimentellen und korrespondierenden theoretischen Kurven eines Mb-Derivates mit einem einzigen Satz von Fitparametern zu einer guten Übereinstimmung gebracht wurden. Die Fitparameter, die diese Bedingung erfüllten, beschreiben den Raman-Streutensor des entsprechenden Derivates. Aus diesem Streutensor können nun die Anregungsprofile für die entsprechenden Kristalle berechnet werden. Dies wird im folgenden beschrieben.

3. Festlegung des molekularen Koordinatensystems

Zur Beschreibung des Raman-Streutensors im Molekülsystem muß ein Koordinatensystem definiert werden, das das Häm-molekül eindeutig festlegt. Die in Gleichung /27/ von McClain (33) dargestellten Tensoren für das Häm-molekül sind unter der Voraussetzung der D_{4h} -Symmetrie des Häm-moleküls ausgerechnet worden. Hier liegt die z-Achse des Molekülsystems parallel zur vierzähligen Symmetrieachse (die Hämnormale). Die x- und y-Achsen liegen in der Hämebene und sind parallel zur Schnittlinie der Spiegelebenen σ_v mit der Hämebene. Diese können die Verbindungslinien N_A-N_C und N_B-N_D sein (siehe Abb. 2) oder den um 45° um die z-Achse gegenüber diesen Verbindungslinien gedrehten Achsen entsprechen.

Da die Symmetrie des Häm-moleküls durch unbekannte Molekülverzerrungen niedriger als D_{4h} ist (Philips (7), Takano (5)), ist es schwer, eine eindeutige Hämebene und somit eine eindeutige Hämnormale zu definieren. Eine Definition der x- und y-Achse

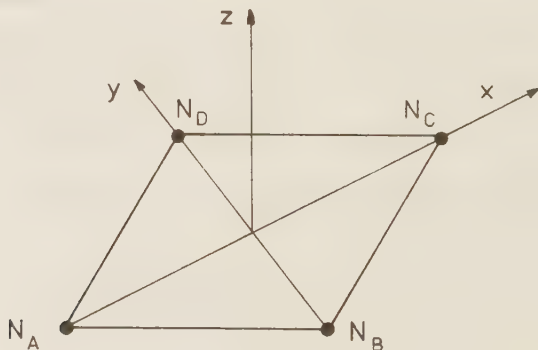
ist ebenfalls schwierig, weil die vier Stickstoffatome des Porphyrinringes nicht in einer Ebene liegen (siehe Abb. 6). Dieses Problem wurde wie folgt gelöst:

Die Hämnormale (die molekulare z-Achse) wurde im Bezug auf die Kristallachsen a , b , c^* durch die polarisierte optische Absorption an Mb-Kristallen zuerst bestimmt. Die Richtungen N_A-N_C und N_B-N_D wurden im Bezug auf die Kristallachsen a , b , c^* durch die Atomkoordinaten der Stickstoffatome N_A , N_B , N_C und N_D bestimmt. Da die Hämverzerrungen nicht zu groß sein können, werden die x- und y-Achsen des Hämoleküls nicht viel von diesen Richtungen abweichen.

In einem ersten Schritt wurde die x-Achse in Richtung N_A-N_C gelegt. Diese Richtung ist jedoch nicht senkrecht zu z. Sie weicht um einen kleinen Winkel ab. Im nächsten Schritt wurde die x-Richtung um diesen verstellt und damit senkrecht zu z gelegt. Diese neue Richtung verbindet nun nicht mehr N_A und N_C . Durch Drehung des Koordinatensystems um die z-Achse um einen kleinen Winkel kann die exakte x-Richtung ermittelt werden. Der Drehwinkel ϑ wurde als Fitparameter innerhalb einer Variation von $\pm 5^\circ$ so bestimmt, daß mit den aus der Lösung erhaltenen Fitparametern die Kristalldaten am besten mit den experimentellen übereinstimmten.

Die molekulare y-Achse wurde dann rechnerisch durch die Orthogonalitätsbedingungen auf z- und x-Achse ermittelt.

Die so erhaltenen x- und y-Achsen wurden dann als molekulare Achsen betrachtet.



3.1. Berechnung der Richtungskosinus der Hämnormalen aus den Daten der polarisierten optischen Absorption

Aus Gleichung /42a/ oder /42b/ lassen sich die Richtungskosinus der Hämnormalen berechnen. Dafür sind die Dicke und Mb-Konzentration des gemessenen Kristalls notwendig. Man mißt im allgemeinen die optische Dichte OD:

$$OD = \epsilon \cdot c \cdot d$$

c: Konzentration

d: Kristalldicke

ϵ : Extinktionskoeffizient

Die Kristalldickenmessung ist sehr fehlerhaft. Durch Gleichungen /43a/ und /43b/ lassen sich aber diese Richtungskosinus der Hämnormalen unabhängig von der Kristalldicke und der Mb-Konzentration wie folgt berechnen:

Die Messungen an der (axb)-Fläche liefern das Polarisationsverhältnis

$$\frac{OD_{||b}}{OD_{||a}} = \frac{1 - \cos^2(z \ b)}{1 - \cos^2(z \ a)} = A \quad /48/$$

(Richtung des einfallenden Strahles ist parallel zu $\hat{c}$; Bezugssystem sind die Kristallachsen a, b, c^* .)

und an der (bxc)-Fläche

$$\frac{OD_{||c}}{OD_{||b}} = \frac{1 - \cos^2(z \ c)}{1 - \cos^2(z \ b)} = B \quad /49/$$

(Einfallender Strahl ist parallel a^* , Bezugssystem sind die Kristallachsen a^* , b, c.)

Gleichungen /48/ und /49/ enthalten Variable, die nicht im gleichen Koordinatensystem beschrieben sind.

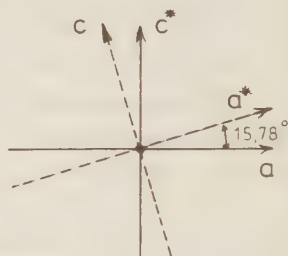
In Gleichung /48/ gilt das Kristallkoordinatensystem a, b, c^* und für Gleichung /49/ gilt dagegen das System a^* , b, c.

Die beiden Systeme gehen durch Drehung um die b-Achse um 15.78° ineinander über (siehe Kapitel I § 1.4).

Die Raman-Messungen an Kristallen wurden im a, b, c* System durchgeführt.

Die Richtungskosinus in Gleichung /49/ wurden dann auf dieses System wie folgt umgerechnet:

Die Achsen a*, b und c haben mit den Achsen a, b, c* folgende Richtungskosinus:



$$a^*-\text{Achse: } \cos(a^* a) = \cos 15.78^\circ = 0.9623$$

$$\cos(a^* b) = \cos 90^\circ = 0.0$$

$$\cos(a^* c^*) = \cos (90 - 15.78) = + 0.272$$

$$b\text{-Achse : } \cos(b a) = 0$$

$$\cos(b b) = 1$$

$$\cos(b c^*) = 0$$

$$c\text{-Achse : } \cos(c a) = \cos (90 + 15.78) = - 0.272$$

$$\cos(c b) = \cos 90 = 0.0$$

$$\cos(c c^*) = \cos 15.78 = 0.9623$$

Die Richtungskosinus der Hämnormalen im a, b, c* Koordinatensystem lassen sich dann im a*, b, c-System umschreiben.

Es gilt:

$$\begin{aligned} \cos(z a^*) &= \cos(a^* a) \cdot \cos(z \cdot a) + \cos(a^* b) \cdot \cos(z \cdot b) + \cos(a^* c^*) \cdot \cos(z \cdot c^*) \\ &= 0.9623 \cos(z \cdot a) + 0 + 0.272 \cdot \cos(z \cdot c^*) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \cos(z b) &= \cos(b \cdot a) \cdot \cos(z \cdot a) + \cos(b \cdot b) \cdot \cos(z \cdot b) + \cos(b \cdot c) \cdot \cos(z \cdot c) \\ &= 0 + \cos(z \cdot b) + 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \cos(z c) &= \cos(c \cdot a) \cdot \cos(z \cdot a) + \cos(c \cdot b) \cdot \cos(z \cdot b) + \cos(c \cdot c) \cdot \cos(z \cdot c) \\ &= - 0.272 \cdot \cos(z \cdot a) + 0 + 0.9623 \cdot \cos(z \cdot c^*) \end{aligned}$$

Die Transformationsmatrix für die Hämnormale zwischen den beiden Koordinatensystem ist dann gleich:

$$\begin{pmatrix} \cos(z a^*) \\ \cos(z b) \\ \cos(z c) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0.9623 & 0 & 0.272 \\ 0 & 1 & 0 \\ -0.272 & 0 & 0.9623 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos(z a) \\ \cos(z b) \\ \cos(z c^*) \end{pmatrix} / 50 /$$

Durch Multiplikation von Gleichung /48/ mit Gleichung /49/ bekommt man:

$$\frac{1 - \cos^2(z \cdot c)}{1 - \cos^2(z \cdot a)} = A \cdot B$$

nach Umformen

$$\cos^2(z \cdot b) = A \cdot B \cdot \cos^2(z \cdot a) - A \cdot B + 1 \quad / 51 /$$

Setzt man $\cos(z \cdot c)$ aus Gleichung /50/ in /51/ ein, so erhält man folgende Gleichung:

$$0.926 \cos^2(z \cdot c^*) + (0.074 - AB) \cdot \cos^2(z \cdot a) + 0.524 \cos(z \cdot c^*) \cdot \cos(z \cdot a) + AB - 1 = 0 \quad / 52 /$$

Nach Umformen von /48/ und Benutzung der Orthogonalitätsgleichung

$$\cos^2(z \cdot a) + \cos^2(z \cdot b) + \cos^2(z \cdot c^*) = 1 \quad / 53 /$$

erhalten wir:

$$\cos^2(z \cdot c^*) + (1 + A) \cdot \cos^2(z \cdot a) - A = 0 \quad / 54 /$$

Die Gleichungen /52/ und /54/ stellen ein nichtlineares Gleichungssystem der Variablen $\cos(z \cdot c^*)$ und $\cos(z \cdot a)$ dar. Dies läßt sich mit Hilfe eines Rechenprogrammes für die bekannten Größen A und B (Polarisationsverhältnisse) lösen.

Diese Berechnung gilt nur unter der Voraussetzung, daß die optische Absorption exakt x,y-polarisiert ist. Die β -Bande erfüllt diese Bedingung (Eaton⁽²³⁾). Deshalb wurden die Werte für A und B an dieser Bande aus den polarisierten optischen Spektren entnommen (siehe Abb. 17a, 17b, 18a, 18b).

Wir erhielten folgende Richtungskosinus der Hämnormalen:

3.1.1 für Deoxy-Mb

$$A = 3.72 \pm 0.05, \quad B = 1.22 \pm 0.02$$

$$\begin{array}{lll} \cos(\alpha) = -0.883 & \cos(\beta) = 0.425 & \cos(\gamma^*) = -0.20 \\ (152^\circ) & (64,8^\circ) & (101,5^\circ) \end{array}$$

3.1.2 für Met-Mb-CN

$$A = 2.85 \pm 0.05, \quad B = 1.26 \pm 0.02$$

$$\begin{array}{lll} \cos(\alpha) = -0.85 & \cos(\beta) = 0.454 & \cos(\gamma^*) = -0.2672 \\ (148^\circ) & (63^\circ) & (105,5^\circ) \end{array}$$

Der Winkel zwischen der Hämnormalen für Deoxy-Mb und der für Met-Mb-CN beträgt ca. $5^\circ \pm 2^\circ$. Daraus können wir schlußfolgern, daß das Hämolekül sich durch das Ligandieren relativ zu den Kristallachsen umorientiert.

Takano (6) hat die Richtungskosinus der Hämnormalen aus den Röntgendaten für Deoxy-Mb und Met-Mb-H₂O ermittelt. Diese Hämnormalen beziehen sich auf eine nur durch die vier Stickstoffatome gemittelte Hämebene.

Die Richtungskosinus der so erhaltenen Hämnormalen sind:

	$\cos(\alpha)$	$\cos(\beta)$	$\cos(\gamma^*)$
Deoxy-Mb:	0.8724	0.4493	0.1927
Met-Mb-H ₂ O:	0.8675	0.4548	0.2017

Die Übereinstimmung zwischen den Richtungskosinus der Hämnormalen für Deoxy-Mb berechnet aus den Röntgendaten und aus den optischen Messungen ist gut. Dagegen ist diese für Met-Mb-CN und Met-Mb-H₂O nicht befriedigend. Dies liegt am Liganden, da Mb das CN⁻ viel stärker als H₂O bindet (Antonini (3)). Röntgendaten von Met-Mb-CN sind nicht vorhanden.

3.2 Grobe Festlegung der x- und y-Achsen aus den Atomkoordinaten

Tabelle (3) listet die Atomkoordinaten der vier Stickstoffatome des Porphyrinringes (siehe Abb. 2) für Deoxy-Mb auf. Diese Koordinaten sind auf die Kristallachsen a, b und c* bezogen, während die ursprünglichen auf die a*, b, c-Achsen bezogen sind (Philips (7)). Ihr maximaler absoluter Fehler liegt zwischen 0.1 und 0.2 Å.

Kristall- achsen \ Atom	N _A	N _B	N _C	N _D
a = X	15.068	13.8	14.6	15.78
b = Y	29.133	26.616	26.541	29.164
c* = Z	6.273	6.0	3.3	3.59

Tabelle (3): Atomkoordinaten der vier Stickstoffatome des Porphyrinringes in Å nach Philips (7).

Die Atome des Porphyrinringes sind nicht koplanar (Takano (5,6), Philips (7)). Deshalb ist die Festlegung einer Ebene durch die vier Stickstoffatome nicht eindeutig und somit kann man keine eindeutige Hämnormale definieren.

Die Richtungen N_A-N_C und N_B-N_D wurden bezüglich der Kristallachsen a, b und c* aus den Atomkoordinaten bestimmt. Ihre Richtungskosinus sind in der Tabelle (4) zusammengefaßt.

Die Richtung	Mit der a-Achse	mit der b-Achse	mit der c^* -Achse
$N_A-N_C = x$	$\cos(xa)=-0.118$	$\cos(xb)=0.653$	$\cos(xc^*)=-0.75$
$N_B-N_D = y$	$\cos(ya)=0.492$	$\cos(yb)=0.633$	$\cos(yc^*)=-0.598$

Tabelle (4): Die Richtungskosinus zwischen den gewählten Richtungen N_A-N_C , N_B-N_D und den Kristallachsen a, b, c^* . Diese wurden aus den Atomkoordinaten in Tabelle (3) ausgerechnet.

Die so gewählten Richtungen stehen weder senkrecht zueinander noch senkrecht zur im vorherigen Abschnitt berechneten Hämnormale. Ursachen dafür sind:

- Das Hämmolekül ist verzerrt. Die Form dieser Verzerrung ist nicht bekannt. Deshalb kann man die Gleichgewichtslage der D_{4h} -Symmetrie dieses Moleküls nicht festlegen. Es ist aber aus den Röntgendaten bekannt, daß die Atome dieses Moleküls nicht koplanar liegen. Dies allein läßt die so gewählten Richtungen nicht senkrecht zueinander stehen.
- Die optisch ermittelte Hämnormale braucht nicht mit der geometrisch durch die Atomkerne ermittelten übereinzustimmen. Sie hängt von der Elektronenverteilung des Systems ab, die sich durch kleine Änderung der Kernkoordinaten stark ändern kann. Sie ist für die Bestimmung des Raman-Streutensors relevant, weil dieser Tensor durch die elektronischen Matrixelemente bestimmt wird.
- Der absolute Meßfehler der Atomkoordinaten verfälscht stark die errechneten Richtungskosinus, da zu ihrer Berechnung die Differenzen der Atomkoordinaten eingehen. Der Richtungskosinus $\cos(xa)$ ist hier am meisten betroffen. Er könnte in dem Bereich von -0.06 bis -0.168 liegen. Die Richtungskosinus

$\cos(xb)$ und $\cos(xc^*)$ haben dagegen einen maximalen Fehler von weniger als 10%.

Die gewählten Richtungen können deshalb nicht als molekulare x-,y-Achsen betrachtet werden.

3.3 Genaue Bestimmung der x- und y-Achsen mit Hilfe des Fitverfahrens

Die optisch ermittelte Hämnormale wurde als die richtige z-Achse des molekularen Koordinatensystems betrachtet.

Die molekulare x-Achse läßt sich dann aus der Richtung N_A-N_C wie folgt festlegen: Diese Richtung läßt sich durch Drehen senkrecht zur z-Achse einstellen. Diese Drehung wird durchgeführt, indem $\cos(xa)$ festgehalten wird und gleichzeitig $\cos(xb)$ und $\cos(xc^*)$ variiert werden. In diesem Fall muß wegen $x \perp z$ gelten:

$$\left. \begin{array}{l} \cos(za) \cdot \cos(xa) + \cos(zb) \cdot \cos(xb) + \cos(zc^*) \cdot \cos(xc^*) = 0 \\ \text{und} \\ \cos^2(xa) + \cos^2(xb) + \cos^2(xc^*) = 1 \end{array} \right\} / 55 /$$

Die Richtungskosinus $\cos(xb)$ und $\cos(xc^*)$ lassen sich aus Gleichung / 55 / für den bekannten $\cos(xa)$ berechnen.

Die Richtungskosinus der y-Achse lassen sich dann aus den Orthogonalitätsbedingungen in Bezug auf x- und z-Achse, und aus der Gleichung

$$\cos^2(ya) + \cos^2(yb) + \cos^2(yc^*) = 1$$

ermitteln.

Die so erhaltenen Richtungskosinus des molekularen Koordinatensystems benutzen wir, um den Streutensor gemäß Gleichung / 30a / vom molekularen ins Kristallkoordinatensystem zu transformieren (siehe auch Anhang).

Die Intensitätsprofile des Deoxy-Mb- bzw. des Met-Mb-CN-Kristalls wurden dann mit einem Satz von Fitparametern berechnet. Diesen Satz erhielten wir aus dem Fitverfahren für Deoxy-Mb- bzw. Met-Mb-CN in Lösung. Anschließend wurden die berechneten Intensitätsprofile mit den experimentellen verglichen.

Da $\cos(xa)$ den größten absoluten Fehler besaß (siehe 3.2), ließen wir ihn innerhalb seiner Fehlergrenzen von (-0.168) bis (-0.06) variieren bis wir die beste Übereinstimmung zwischen den berechneten und den gemessenen Intensitätsprofilen erhielten. Dadurch erreichten wir eine feine Einstellung der molekularen Achsen.

Wir benötigten also zur Berechnung der Intensitätsprofile des Kristalls einen weiteren Parameter $\cos(xa)$.

Mit Hilfe der optischen Messungen und dieses Fitverfahrens erhielten wir die exakte Lage des molekularen Koordinatensystems bezüglich der Atomkoordinaten des Hämoleküls. Dadurch ist es uns gelungen, die Hämorientierung zum Protein mit dieser neuen Methode zu ermitteln.

4. Ergebnisse des Fitverfahrens

Tabelle (5) listet die benutzten Fitparameter und ihre Bedeutung auf. Zunächst werden die Fitergebnisse der einzelnen Derivate behandelt.

4.1. Deoxy-Mb

4.1.1 Fitparameter der Linien 1355 cm^{-1} und 1564 cm^{-1}

Tabelle (6) zeigt die für die beiden Raman-Linien passenden Fitparameter. Die durchgezogenen Kurven in Abb. (21,22) stellen die durch das Fitverfahren berechneten Dispersionskurven des Depolarisationsgrades in Lösung sowie die Intensitätsprofile des Deoxy-Mb in Lösung und im Kristall dar. Diese Kurven wurden mit demselben Satz von Fitparametern gerechnet. Die Übereinstimmung zwischen den gemessenen und den gerechneten Kurven ist innerhalb des Meßfehlers gut.

Tabelle (5): Liste der Fitparameter

Fitparameter	Bedeutung
$\alpha_{e,s}^{\Gamma}$	Komplexe Konstanten für jeden Tensor $\hat{T}$ der Darstellung $\Gamma = A_{1g}, A_{2g}, B_{1g}$ oder B_{2g} und des Soret-Übergangs für $e, s = B, B$, des α -Übergangs für $e, s = Q, Q$ oder der Herzberg-Teller-Kopplung für $e, s = Q, B$.
$C_{e,s}$	Verhältnis der Franck-Condon-Überlappintegrale der entsprechenden elektronischen Übergänge (Soret ($e,s=B,B$) , α ($e, s = Q, Q$) oder Herzberg-Teller-Kopplung ($e, s = Q, B$))
$\tilde{\nu}_{\mu}$	Frequenz der repräsentativen Schwingung
γ^B	Halbwertsbreite der Soret-Bande
γ^Q	Halbwertsbreite der α -Bande

Tabelle 6: Die erhaltenen Fitparameter aller untersuchten Derivate

Fitparameter		Deoxy-Mb		Met-Mb-CN		Met-Hb-CN	
		1355 cm ⁻¹	1564 cm ⁻¹	1373 cm ⁻¹	1580 cm ⁻¹	1373 cm ⁻¹	1580 cm ⁻¹
α	A _{1g} QQ	Re	- 0.68	-	-	- 3.76	-
		Im	2.3	-	-	3.76	-
α	A _{1g} BB	Re	1.4	3.2	0.33	3.04	0.33
		Im	7.48	3.2	6.7	9.05	6.7
α	A _{2g} QB	Re	-	2.48	- 1.3	- 3.76	2.16
		Im	-	8.3	0.13	0.376	9.25
α	B _{1g} QQ	Re	-	-	-	2.1	-
		Im	-	-	-	- 6.26	-
α	B _{1g} QB	Re	-	-	- 3.4	- 8.6	-
		Im	-	-	- 2.8	- 4.5	-
α	B _{1g} BB	Re	-	-	-	2.26	-
		Im	-	-	-	- 0.376	-

α	B_{2g}	Re	1.7	3.8	-	2.16	2.26	2.16
	Q_Q	Im	-	- 1.9	-	- 4.5	0.754	- 4.5
α	B_{2g}	Re	0.88	-	0.26	-	- 0.3	-
	Q_B	Im	-	-	2.3	-	5.28	-
α	B_{2g}	Re	1.6	3.36	-	-	-	-
	B_B	Im	-	- 1.23	-	-	-	-
χ^Q	$[cm^{-1}]$		900	900	950	950	950	950
χ^B	$[cm^{-1}]$		1900	1900	1870	1870	1870	1870
$\tilde{\nu}_\mu$	$[cm^{-1}]$		1440	1440	1430	1500	1430	1580
C_{QQ}^H			0.003	0.01	0.003	0.01	-	0.01
C_{QB}^H			0.039	-	0.04	-	-	-
C_{BB}^H			0.004	0.004	0.004	-	-	-
$\tilde{C}_{QB}^H$			0.039	0.04	0.04	-	-	-

Fortsetzung der Tabelle 6:

4.1.2 Richtungskosinus des molekularen Koordinatensystems im Bezug auf das Kristallsystem a , b , c^* .

Die durch das Fitverfahren ermittelten Richtungskosinus des molekularen Koordinatensystems sind in Tabelle (7) dargestellt. Die Abweichungen zwischen dem gerechneten und dem durch die Atomkoordinaten festgelegten Koordinatensystems liegen zwischen 2° und 10° .

Molekulare Achsen	Die Richtungskosinus mit den			Bestimmungsverfahren
	a	b	c^*	
x-Achse	$\cos(xa)$	$\cos(xb)$	$\cos(xc^*)$	Raman-Streuung an Mb in Kristall und Lösung
Deoxy-Mb	-0.06	-0.525	-0.849	
Met-Mb-CN	-0.12	-0.66	-0.742	
y-Achse	$\cos(ya)$	$\cos(yb)$	$\cos(yc^*)$	
Deoxy-Mb	+0.466	+0.738	-0.4884	
Met-Mb-CN	+0.513	+0.599	-0.615	
z-Achse	$\cos(za)$	$\cos(zb)$	$\cos(zc^*)$	polarisierte optische Absorption am Mb-Kristall
Deoxy-Mb	-0.883	+0.425	-0.20	
Met-Mb-CN	-0.85	+0.454	-0.2672	

Tabelle (7): Die Richtungskosinus des molekularen Koordinatensystems im Bezug auf die Kristallachsen a , b , c^* für Deoxy-Mb und Met-Mb-CN.

4.2. Met-Mb-CN

4.2.1 Fitparameter der Raman-Linien 1373 cm^{-1} und 1580 cm^{-1}

Tabelle (6) listet die für die beiden Raman-Linien passenden Fitparameter auf. Mit diesen Parametern wurden die Dispersionskurven des Depolarisationsgrades, die Intensitätsprofile des Met-Mb-CN in Lösung und im Kristall berechnet. Die Ergebnisse dieser Rechnung sind in den Abbildungen (24) und (25) durch die durchgezogenen Linien dargestellt. Die Übereinstimmung zwischen den gemessenen und den berechneten Kurven ist innerhalb des Meßfehlers gut.

4.2.2 Richtungskosinus des molekularen Koordinatensystems in Bezug auf das Kristallsystem a , b , c^*

Tabelle (7) zeigt die aus dem Fitverfahren erhaltenen Richtungskosinus. Sie weichen ebenfalls von jenen ab, die durch die Atomkoordinaten ermittelt worden sind. Ihre Abweichungen sind geringer als bei Deoxy-Mb.

4.3. Vergleich zwischen Deoxy-Mb und Met-Mb-CN

Aus den Fitparametern in Tab. (6) können wir entnehmen:

1. In den Raman-Linien 1355 cm^{-1} und 1373 cm^{-1} (Oxidationsmarker) tragen hauptsächlich die A_{1g} -Parameter zum Polarisierbarkeitstensor bei. Zusätzlich kommen hier Beimischungen der Moden B_{2g} bei Deoxy-Mb und B_{1g} , B_{2g} und A_{2g} bei Met-Mb-CN hinzu.
2. In den Raman-Linien 1564 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} tragen hauptsächlich die A_{2g} -Parameter zum Polarisierbarkeitstensor bei. Hier kommen Beimischungen von Parametern A_{1g} , B_{1g} und B_{2g} vor.
3. Alle $\alpha_{e,s}^{\Gamma}$ in beiden Mb-Derivaten sind komplex. Dies widerspricht den theoretischen Erwartungen, weil die Matrixelemente reell sind. Dies könnte an der Beteiligung von Prozessen höherer Ordnung liegen (siehe Diskussion).

4. Die Beiträge von Franck-Condon-Übergängen C_{QQ} und C_{BB} sowie die der Herzberg-Teller-Kopplung C_{QB} sind sehr klein.
5. Die berechnete Halbwertsbreite der Soret-Bande γ^B für Deoxy-Mb und Met-Mb-CN stimmt sehr gut mit der experimentell ermittelten überein. Die Halbwertsbreite der α -Bande γ^Q ist kleiner als die der Soret-Bande. Ein experimenteller Wert für die α -Bande ist wegen der starken Überlappung mit der β -Bande (siehe Abb. 14,15) nicht ermittelbar.
6. Die Frequenz $\tilde{\nu}_\mu$ der repräsentativen Schwingung, die den elektronischen Übergang Q ($0 \rightarrow 1$) erzeugt (β -Bande), stimmt gut mit der Energiedifferenz zwischen α - und β -Bande überein.
7. Das molekulare Koordinatensystem für Met-Mb-CN stimmt nicht mit dem für Deoxy-Mb überein. Der Winkel zwischen den beiden Hämnormalen sowie zwischen den x- bzw. y-Achsen beträgt $5^\circ + 2^\circ$. Abb. (32) stellt die beiden Koordinatensysteme bezogen auf die Atomkoordinaten der vier Stickstoffatome dar. Diese sind aus den Röntgendaten für Deoxy-Mb von Philips (7) entnommen. Die x- bzw. y-Achsen liegen fast parallel zur Verbindungslinie N_A-N_C bzw. N_B-N_D .

4.4 Met-Hb-CN

Tabelle (6) listet die erhaltenen Fitparameter dieses Derivates auf. Die mit diesen Parametern berechneten Intensitätsprofile und Dispersionskurven des Depolarisationsgrades der Raman-Linien 1373 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} sind in Abb.(27) (durchgezogene Linien) dargestellt.

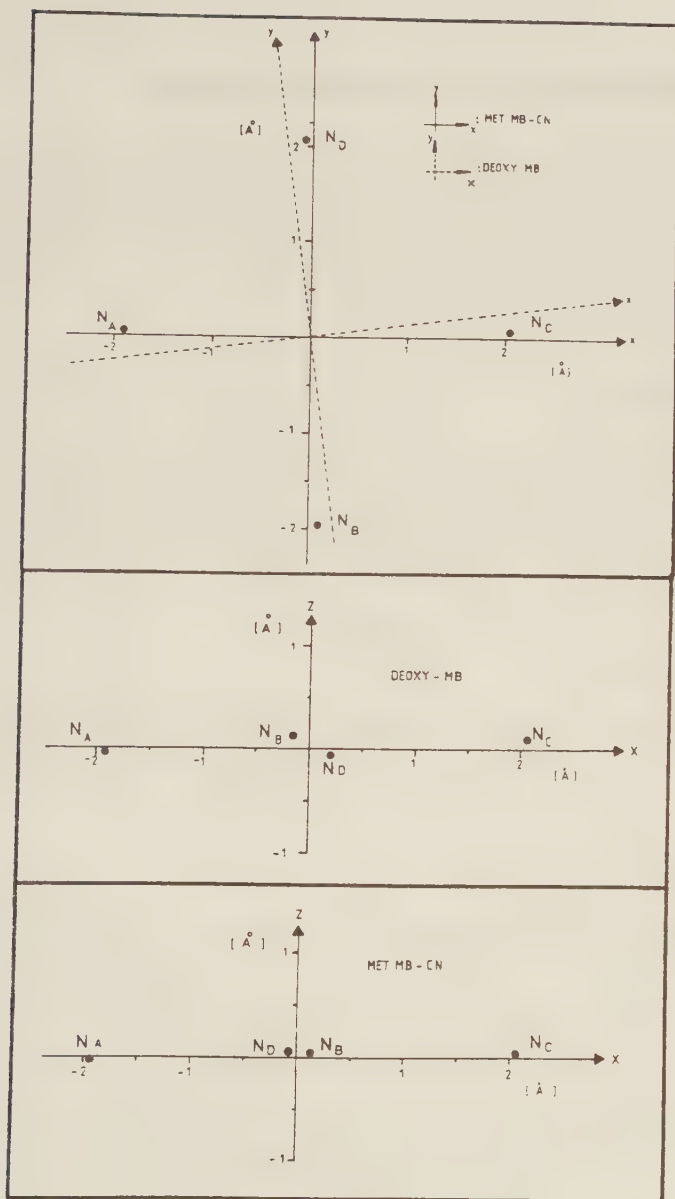


Abb. 32: Lage der vier Stickstoffatome (N_A , N_B , N_C , N_D) des Porphyrinringes im Bezug auf die ermittelten molekularen Achsen (x, y, z) für Deoxy-Mb und Met-Mb-CN.

V. pH-Abhängigkeit der untersuchten Derivate

Wir haben am Anfang dieser Arbeit vorausgesetzt, daß der Raman-Streutensor der untersuchten Derivate in Lösungen pH unabhängig sein soll. Um dies zu prüfen wurden die Depolarisationsgrade und die Intensitätsprofile für Mb und Hämoglobin (Hb) in Lösung im pH-Bereich von 4.0 bis 9.0 gemessen. Wir erhielten folgende Ergebnisse:

1. Deoxy-Mb

Abb. (33) zeigt die Intensitätsprofile und die Dispersionskurven des Depolarisationsgrades der Raman-Linien 1355 cm^{-1} und 1564 cm^{-1} für verschiedene pH-Werte. Innerhalb des Meßfehlers sind die Intensitätsprofile und der Depolarisationsgrad pH unabhängig.

2. Met-Mb-CN

Abb. (34) stellt die entsprechenden Kurven der Raman-Linien 1373 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} für verschiedene pH-Werte dar. Hier ist ebenfalls keine pH-Abhängigkeit feststellbar.

3. Met-Hb-CN

Zur Erweiterung der Meßergebnisse wurde das Met-Hb-CN Derivat untersucht.

Abb. (35) stellt die Intensitätsprofile und die Dispersionskurve des Depolarisationsgrades der Raman-Linien 1373 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} dieses Derivates für verschiedene pH-Werte dar. Innerhalb des Meßfehlers sind diese pH unabhängig. Im Gegensatz dazu zeigen die Intensitätsprofile und die Dispersionskurve des HbO_2 eine Variation durch Änderung des pH-Wertes (Schweitzer et al. (32)).

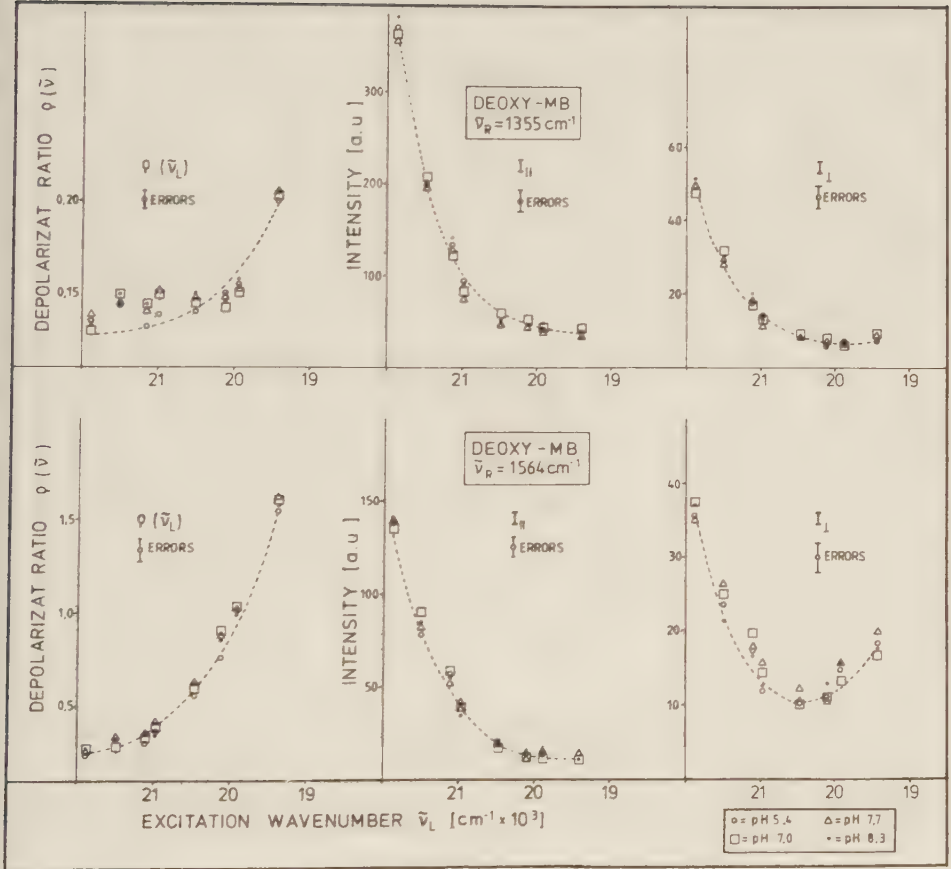


Abb. 33: Dispersionskurven des Depolarisationsgrades und die Intensitätsprofile des Deoxy-Mb in Abhängigkeit vom pH-Wert der Deoxy-Mb-Lösung.

Oberer Teil: Die Raman-Linie 1373 cm^{-1}
 Unterer Teil: Die Raman-Linie 1580 cm^{-1}

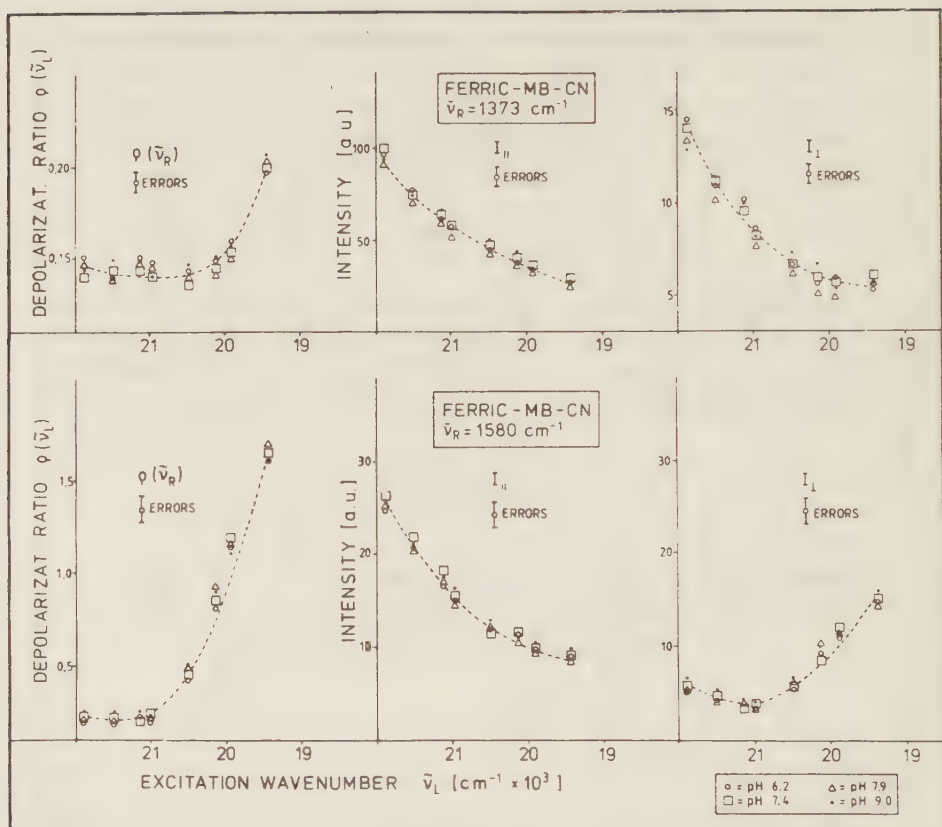


Abb. 34: Dispersionskurven des Depolarisationsgrades und die Intensitätsprofile des Met-Mb-CN in Abhängigkeit vom pH-Wert der Met-Mb-CN-Lösung.

Oberer Teil: Die Raman-Linie 1373 cm^{-1}

Unterer Teil: Die Raman-Linie 1580 cm^{-1}

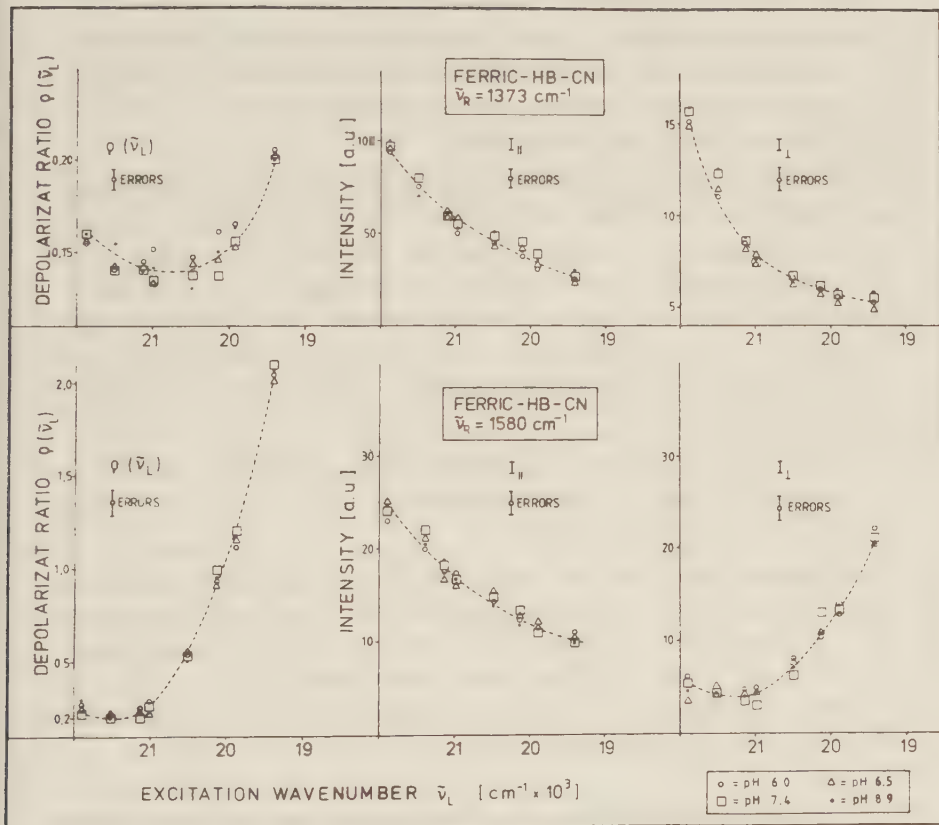


Abb. 35: Dispersionskurven des Depolarisationsgrades und die Intensitätsprofile des Met-Hb-CN in Abhängigkeit vom pH-Wert der Met-Hb-CN-Lösung.

Oberer Teil: Die Raman-Linie 1373 cm^{-1}

Unterer Teil: Die Raman-Linie 1580 cm^{-1}

VI Diskussion

1. Diskussion des theoretischen Ansatzes und des Fitverfahrens

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, daß der hier verwendete theoretische Ansatz zur Beschreibung des Raman-Streutensors an Hämproteinen geeignet ist. Wir können diese Schlußfolgerung anhand der folgenden Ergebnisse begründen:

- a) Sieben unabhängige experimentelle Datensätze (Depolarisationsgraddispersion DPG, die korrespondierenden Anregungsprofile der Ramanlinien des Lösungsspektrums IP, vier Anregungsprofile der entsprechenden Linien des Kristallspektrums) eines Hämkomplexes (Deoxy-Mb bzw. Met-Mb-CN) wurden mit einem einzigen Satz von Fitparametern gleichzeitig angepaßt. Dies bedeutet, daß der Raman-Streutensor aus diesen Fitparametern berechnet werden kann.
- b) Die aus den Fitparametern ermittelten Halbwertsbreiten γ^B und γ^Q stimmen größenordnungsmäßig mit denen der optischen Soret- und α -Bande überein.
- c) Die Dispersionskurve des Depolarisationsgrades wurde mit diesem Fitverfahren für den Frequenzbereich von 17000 cm^{-1} bis 21000 cm^{-1} vorausgesagt. Entsprechende Messungen der 1583 cm^{-1} und der 1638 cm^{-1} Linie des Oxyhämoglobinspektrums im Bereich der α -Bande (Schweitzer (35)) ergaben eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment.

Die dargestellten Ergebnisse der Computerfits an Depolarisationsdispersionskurven aus Ramanlinien des Deoxy-Mb, Met-Mb-CN und Met-Hb-CN Spektrums zeigen, daß mit dem verwendeten theoretischen Ansatz die Ramanstreuung an Hämproteinen beschrieben werden kann.

Es bleiben aber einige Fragen offen. Bei keinem Fit konnte auf die imaginären Anteile der Fitkonstanten $\alpha_{e,s}^r$ verzichtet werden (dies gilt im übrigen auch für Deoxy-Hb und Oxy-Hb (Schweitzer-Stenner et al. (34), Schweitzer (35))). Dies ist verwunderlich,

denn ohne ein äußeres Magnetfeld sind die elektronischen Wellenfunktionen des H₂ reell (Long (40)). Zwar schließt Barron (65, 66) die Möglichkeit von Spin-Bahn-Kopplung nicht aus, aber es gibt dafür keine eindeutigen experimentellen Belege.

Zur Klärung dieses Widerspruchs müssen die Voraussetzungen des verwendeten theoretischen Ansatzes näher betrachtet werden. Gleichung /29/ erhält man, indem auch die Elektron-Phonon-Wechselwirkung zeitabhängig gerechnet wird (Peticolas et al. (22), Loudon (21)). Gleichung /29/ berücksichtigt aber noch die Anregung nicht Raman-aktiver Phononen der Frequenz $\tilde{\nu}_\mu$. Sie beschreibt die Übergänge:

$$|0R, 0\mu\rangle^{e,s} \longrightarrow |1R, 0\mu\rangle^{e,s}, \quad |0R, 0\mu\rangle^{e,s} \longrightarrow |0R, 1\mu\rangle^{e,s}, \quad |0R, 0\mu\rangle^{e,s} \longrightarrow |1R, 1\mu\rangle^{e,s},$$

durch entsprechende Franck-Condon-Überlappungsintegrale ($e, s = Q, B$). D.h. der Rahmen der zeitabhängigen Störungsrechnung wird für das nicht Raman-aktive Phonon verlassen.

Dies ist aber genau genommen ein nicht konsistentes Verfahren.

Eine Berücksichtigung des μ -ten Phonons in zeitabhängiger Störungsrechnung führt zu einem Term 5-ter Ordnung im Loudonschen Formalismus und damit zu neuen komplexen Energienennern mit Resonanzstellen bei:

$$|0R, 1\mu\rangle^{e,s}, |1R, 0\mu\rangle^{e,s} \text{ und } |1R, 1\mu\rangle^{e,s}.$$

Schweitzer et al. (34) haben gezeigt, daß im präresonanten Bereich zwischen Soret- und α -Bande der Ramantensor, der durch zeitabhängige Störungsrechnung 3.Ordnung berechnet wird, eine gute Näherung darstellt, wenn man komplexe Konstanten $\alpha_{e,s}^r$ in Kauf nimmt, die die Beiträge von Energienennern des 5. Ordnung simulieren.

Daraus ist ersichtlich, daß der verwendete theoretische Ansatz noch nicht völlig befriedigt. Er ermöglicht aber die Parametrisierung von sehr komplexen experimentellen Daten.

Die gewonnenen Fitparameter lassen sich physikalisch sinnvoll interpretieren (Schweitzer-Stenner et al. (34)), nämlich als

ein Maß für statische Verzerrungen der Hämgruppe aus ihrer idealen D_{4h} -Symmetrie.

Nichtsdestoweniger erscheint es sinnvoll, in Zukunft den Raman-Streutensor in zeitabhängiger Störungsrechnung 5. Ordnung zu formulieren. Der Formalismus ist aber sehr komplex und ist bisher noch nicht explizit dargestellt worden. Erste Versuche, mit einem solchen Ansatz Depolarisationsdispersionskurven von Oxy-Hb zu analysieren, zeigen aber, daß man mit reellen Fit-Konstanten $\alpha_{e,s}^{\Gamma}$ auskommen kann (Schweitzer-Stenner et al., unveröffentlichte Resultate).

Beim Fitten des Depolarisationsgrades $\rho(\tilde{\nu})_L$ und der Intensitätsprofile kann man B_{1g} - von B_{2g} -Verzerrungen nicht unterscheiden. Dies liegt an den Tensorinvarianten, die den Depolarisationsgrad $\rho(\tilde{\nu})_L$ beschreiben (siehe Gleichungen / 18 / , / 19 /).

Die Intensitätsprofile von Kristallen ermöglichen dagegen die Diskriminierung zwischen B_{1g} - und B_{2g} -Beiträgen. Dies kann wie folgt verdeutlicht werden:

Der Raman-Streutensor $\hat{\beta}$ im Molekülsystem kann nach Gleichung / 25 / in Komponenten ausgedrückt werden. Es gilt:

$$\left. \begin{aligned} \beta_{XX} &= (\alpha_{QQ}^{A_{1g}} + \alpha_{QB}^{A_{1g}} + \alpha_{BB}^{A_{1g}}) + (\alpha_{QQ}^{B_{1g}} + \alpha_{QB}^{B_{1g}} + \alpha_{BB}^{B_{1g}}) \\ \beta_{XY} &= \alpha_{QB}^{A_{2g}} + (\alpha_{QQ}^{B_{2g}} + \alpha_{QB}^{B_{2g}} + \alpha_{BB}^{B_{2g}}) \\ \beta_{YX} &= \alpha_{QB}^{A_{2g}} + (\alpha_{QQ}^{B_{2g}} + \alpha_{QB}^{B_{2g}} + \alpha_{BB}^{B_{2g}}) \\ \beta_{YY} &= (\alpha_{QQ}^{A_{1g}} + \alpha_{QB}^{A_{1g}} + \alpha_{BB}^{A_{1g}}) - (\alpha_{QQ}^{B_{1g}} + \alpha_{QB}^{B_{1g}} + \alpha_{BB}^{B_{1g}}) \end{aligned} \right\} / 55 /$$

Nach Durchführung der Transformation vom Molekülsystem ins Raumsystem gemäß Gleichung /30a/ (siehe Anhang I) erhält man die Tensorkomponenten im Raumsystem und somit die Intensitätsprofile des Kristalls. Es gilt

$$|\beta_{xx}|^2 = |A_{11} \beta_{xx} + A_{12} \beta_{yy} + A_{13} (\beta_{xy} + \beta_{yx})|^2$$

$$|\beta_{xy}|^2 = |B_{11} \beta_{xx} + B_{22} \beta_{yy} + B_{12} \beta_{xy} + B_{21} \beta_{yx}|^2$$

$$|\beta_{yx}|^2 = |B_{11} \beta_{xx} + B_{22} \beta_{yy} + B_{21} \beta_{xy} + B_{12} \beta_{yx}|^2$$

$$|\beta_{yy}|^2 = |C_{11} \beta_{xx} + C_{22} \beta_{yy} + C_{12} (\beta_{xy} + \beta_{yx})|^2$$

/ 56 /

Anhand von Gleichungen /55/ und /56/ kann man erkennen, daß das Vertauschen von $\alpha_{e,s}^{B_{1g}}$ und $\alpha_{e,s}^{B_{2g}}$ völlig andere Kristallintensitätsprofile ergibt. Dadurch kann man diese einzelnen Beiträge unterscheiden.

Außerdem kann man aus Gleichung /55/ und /56/ feststellen, daß $|\beta_{xy}|^2 = |\beta_{yx}|^2$ ist, wenn $\beta_{xy} = \beta_{yx}$ ist. Das ist der Fall, wenn keine $\alpha_{QB}^{A_{2g}}$ Beiträge vorkommen. D.h. allein durch einen Vergleich der Intensitätsprofile $|\beta_{xy}|^2$ und $|\beta_{yx}|^2$ kann man erkennen, ob der Raman-Tensor im Molekülsystem symmetrisch oder antisymmetrisch ist.

2. Diskussion der Fitparameter und der symmetrieklassifizierten Verzerrungen des Hämoleküls

Die Fitparameter $\alpha_{e,s}^{\Gamma}$ stehen nach dem theoretischen Ansatz in Gleichung / 29 / in linearer Beziehung zu statischen Verzerrungen $\delta Q_k^{\Gamma_k}$ des Hämoleküls aus einer idealen D_{4h} -Symmetrie. Aus der Darstellung Γ_R einer gegebenen Ramanlinie in der D_{4h} -Symmetrie und der Darstellung Γ des Tensors $\alpha_{e,s}^{\Gamma} \hat{T}^{\Gamma}$ läßt sich die Darstellung Γ_k der Symmetrieverzerrungen $\delta Q_k^{\Gamma_k}$ eindeutig ermitteln, denn es gilt

$$\Gamma_R \times \Gamma_k = \Gamma$$

Die Darstellungsprodukte, die in der D_{4h} -Symmetrie zum Raman-effekt beitragen, transformieren sich wie A_{1g} , B_{1g} , A_{2g} , B_{2g} . In Tabelle (8) sind alle Produkte, die zum Polarisierbarkeits-tensor beitragen, zusammengestellt.

Anhand der Fitparameter $\alpha_{e,s}^{\Gamma}$ und der Korrelationstabelle (Tabelle (8)) werden nun die Symmetrieverzerrungen des Hämoleküls im Detail diskutiert.

2.1 Molekülverzerrungen, erhalten aus den Fitdaten der Oxidationsmarkerlinie 1355 cm^{-1} (Deoxy-Mb) bzw. 1373 cm^{-1} Met-Mb-CN und Met-Hb-CN

Die Fitparameter $\alpha_{e,s}^{\Gamma}$ dieser Ramanlinie sind in der Tabelle (6) aufgelistet. Da sich diese Ramanlinie in der D_{4h} -Symmetrie wie die Darstellung $\Gamma_R = A_{1g}$ transformiert (Abe et al. (46)), erhält man hier folgende Molekülverzerrungen:

- | | |
|----------------|----------------------------------|
| a) Deoxy-Mb: | A_{1g}, B_{1g} |
| b) Met-Mb-CN : | A_{1g}, B_{1g}, A_{2g} |
| c) Met-Hb-CN : | $A_{1g}, B_{1g}, A_{2g}, B_{2g}$ |

Daraus folgt eine C_{2v} -Symmetrie für das Häm des Deoxy-Mb und eine C_s -Symmetrie für Met-Mb-CN und Met-Hb-CN.

		Verzerrungen			
Schwingungen im ungestörten Molekül	Γ_{Q_R} \ Γ_{Q_k}	A_{1g}	B_{1g}	B_{2g}	A_{2g}
	A_{1g}	A_{1g}	B_{1g}	B_{2g}	A_{2g}
	B_{1g}	B_{1g}	A_{1g}	A_{2g}	B_{2g}
	B_{2g}	B_{2g}	A_{2g}	A_{1g}	B_{1g}
	A_{2g}	A_{2g}	B_{2g}	B_{1g}	A_{1g}

Tabelle 8: Korrelationstabelle für die symmetrieklassifizierten Verzerrungen und die Darstellungen der Ramanmode in D_{4h} - Symmetrie

2.2 Molekülverzerrungen, erhalten aus den Fitdaten der Spinmarkerlinie 1564 cm^{-1} (Deoxy-Mb) bzw. 1580 cm^{-1} Met-Mb-CN und Met-Hb-CN

Die Fitparameter $\alpha_{e,s}^r$ hierfür sind in der Tabelle (6) zusammengefaßt. Diese Ramanlinie transformiert sich in der D_{4h} -Symmetrie wie die Darstellung $\Gamma_R = A_{2g}$ (Abe et al. (46)) und somit bekommt man hier folgende Molekülverzerrungen:

- a) Deoxy-Mb : A_{1g}, B_{1g}, A_{2g}
 b) Met-Mb-CN = Met-Hb-CN : A_{1g}, B_{1g}, A_{2g} .

Aus diesen Daten ergibt sich eine C_s -Symmetrie für diese Häm-komplexe. In allen 3 Molekülen liegen Verzerrungen gleicher Darstellung vor, die aber quantitativ unterschiedlich sind. Die Verzerrungsparameter bei Met-Mb-CN sind identisch mit denen des Met-Hb-CN und größer als die des Deoxy-Mb.

Die erhaltenen symmetrierniedrigenden Verzerrungen und Hämsymmetrien der untersuchten Derivate sind in Tabelle (9) zusammengefaßt.

erhaltene Molekülverzerrung aus den Daten der	Deoxy-Mb	Met-Mb-CN	Met-Hb-CN
Oxidationsmarkerlinie	B_{1g}	B_{1g}, A_{2g}	B_{1g}, A_{2g}, B_{2g}
Spinmarkerlinie	B_{1g}, A_{2g}	B_{1g}, A_{2g}	B_{1g}, A_{2g}
Hämsymmetrie	C_{2v} oder C_2	C_2	C_s oder C_2

Tabelle (9): Symmetrierniedrigende Verzerrungen

Daraus kann man folgendes feststellen:

1. Die Molekülverzerrungen in Deoxy-Mb und Met-Hb-CN bei der Oxidationsmarkerlinie unterscheiden sich von denen der Spinmarkerlinie. Dies scheint ein Widerspruch zu sein, da die Molekülverzerrungen unabhängig von den Ramanlinien sein müssen.
2. Die Molekülverzerrungen hängen vom Ligandierungszustand und von der Wechselwirkung der Hämgruppe mit dem Apoprotein ab. Z.B. werden durch Bindung von CN-Gruppen an das Myoglobin neue Molekülverzerrungen relativ zum unligandierten Zustand (Deoxy-Mb) induziert.

Zum Verständnis dieser Ergebnisse müssen folgende Fragen erörtert werden:

- a) Wodurch können überhaupt die Molekülverzerrungen aus der idealen D_{4h} -Symmetrie verursacht werden?
- b) Warum scheinen die Molekülverzerrungen Ramanlinien-abhängig zu sein?

Die angenommene D_{4h} -Symmetrie des Häms ist wegen der unterschiedlichen und unsymmetrisch angeordneten Seitengruppen

($-CH_3$, $-\overset{H}{\underset{|}{C}} = CH_2$, $-CH_2 - CH_2 - COOH$) nur eine Näherung.

Werden diese Seitengruppen in der Betrachtung der Molekülsymmetrie berücksichtigt, so wird die Symmetrie auf C_s erniedrigt. Die Hämsymmetrie des Deoxy-Mb wird aber unseren Ergebnissen nach, Tabelle (9), nur auf C_{2v} bzw. C_2 erniedrigt.

Dies bedeutet, daß nicht alle Seitengruppen zur Symmetriebetrachtung herangezogen werden müssen. Das ist plausibel, da die Seitenketten je nach Größe und Position unterschiedliche Beiträge zur Symmetrierniedrigung des eigentlichen Porphyrinskeletts beisteuern. Die Propionsäure- und Vinylgruppen tragen wegen ihrer Größe und Position danach den stärksten Anteil zur Symmetrieverzerrungen des Hämoleküls bei. Die alleinige Berücksichtigung der Propiongruppen würde die Symmetrie des Hämoleküls auf C_{2v} erniedrigen. Die Spiegelebene σ_v liegt hier zwischen den Pyrrolringen 1 und 4 entlang der Verbindungslinie $C_m - C_m$. In diesem Fall muß man unabhängig vom Ligandierungszustand entweder eine

B_{2g} - oder eine B_{1g} -Verzerrung in den untersuchten Hämderivaten feststellen. Tabelle (9) zeigt, daß diese Verzerrungen tatsächlich in allen untersuchten Derivaten vorkommen.

Der alleinige Einfluß des Unterschiedes zwischen den $-CH_3$ und $-CH-CH_2$ bzw. (CH_2-CH_2-COOH) Seitengruppen würde ebenfalls eine B_{1g} - bzw. B_{2g} -Verzerrung verursachen.

Die wichtigste Wechselwirkung des Häms mit Apoprotein ist die kovalente Bindung zwischen dem Eisenatom und dem proximalen Histidin F8. Der Abstand N_ϵ (Imidazol)-Fe beträgt etwa 2 Å (Takano (6)). Sie beansprucht hauptsächlich die Bindungen Fe-N Pyrrol. Dies würde eine A_{1g} -Verzerrung erzeugen.

Solche Verzerrungen erhalten die Molekülsymmetrie und tragen somit zum unverzerrten Ramantensor bei. Deshalb ist ihre Diskriminierung von den Beiträgen der ungestörten Ramanschwingung bei dieser Meßmethode nicht möglich.

Eine schwache B_{1g} - bzw. B_{2g} -Verzerrung könnte durch den Imidazolring des proximalen Histidins, der fast parallel zur Verbindungslinie N_1-N_3 liegt, erzeugt werden.

A_{2g} -Verzerrungen werden durch die extrem asymmetrischen Wechselwirkungen des Hämoleküls durch seine Seitenkette mit dem Apoprotein verursacht. Diese können hauptsächlich durch die Peripherieatome des Porphyrinringes zustande kommen.

Die Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und dem umgebenden Protein würden je nach Ligandenart und Bindungsform alle möglichen Verzerrungen mit sich bringen. Ist die Verbindungslinie Ligand-Fe senkrecht auf der Hämebene, so erzeugt der Ligand in diesem Fall eine A_{1g} -Verzerrung. Ist die Verbindungslinie dagegen schräg, können B_{1g} , B_{2g} , A_{2g} -Verzerrungen auftreten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß alle Molekülverzerrungen aus der idealen D_{4h} -Symmetrie hauptsächlich durch die Seitenketten und den Liganden hervorgerufen werden.

Zur Interpretation der Ramanlinienabhängigkeit der Molekülverzerrungen sollen die Normalschwingungen der verwendeten Ramanlinien und ihre Beziehung zu diesen Verzerrungen näher betrachtet werden.

Gleichung /29/ enthält den Zusammenhang zwischen dem gestörten Streutensor und der Molekülverzerrung. Das Matrixelement

$$\langle s | \frac{\partial^2 \hat{H}(Q)}{\partial Q_R \partial Q_K} | g \rangle \cdot \delta Q_K$$

spielt hierfür die entscheidende Rolle. Eine feste Verzerrung δQ_K kann über die Größe dieses Matrixelements verschiedene Ramanschwingungen Q_R unterschiedlich stark beeinflussen. Es ist anzunehmen, daß bei einer vorgegebenen Ramanschwingung die Atome mit den größten Amplituden hauptsächlich zum gestörten Streutensor beitragen.

Die Normalschwingungen der verwendeten Ramanlinien wurden von Abe et al. (46) mit Hilfe der Normalkoordinatenanalyse an Ni-Octa-Ethyl-Porphyrin Ni (OEP) bestimmt. Die Ramanlinie 1383 cm^{-1} bei Ni (OEP) entspricht der Oxidationsmarkerlinie bei Hämkomplexen. Abb. (20a) zeigt ihre Normalschwingung. Diese transformiert sich in der D_{4h} -Symmetrie wie A_{1g} und setzt sich zusammen aus den Schwingungen der vier Pyrrolringe, die in Phase in der Hämebene und entlang der Verbindungslinien Fe- N_{Pyrrol} schwingen, den Streckschwingungen der C_α - N_{Pyrrol} -Atome und aus Streckschwingungen der C_β - C_β - und C_m -H-Atome. Die maximalen Amplituden fallen hier auf die N_{Pyrrol} - und C_α -Atome, während die äußeren C_β -Atome kleine Amplituden haben und sich fast senkrecht zur Verbindungslinie C_β - $C_{\text{Seitenkette}}$ bewegen. Deshalb ist hier ein geringer Einfluß der Umgebung auf das Matrixelement $\langle s | \frac{\partial^2 \hat{H}(Q)}{\partial Q_R \partial Q_K} | g \rangle$ dieser Ramanlinie zu erwarten.

Das Ligandieren eines Hämkomplexes (z.B. mit CN) beansprucht hauptsächlich die Fe- N_{Pyrrol} -Bindung (Warshel (48)). Gibt es eine starke Auslenkung der vier Stickstoffatome und fällt die Verbindungslinie Ligand-Eisenatom nicht mit der Hämnormale zusammen, erwartet man eine starke Wechselwirkung und damit einen hohen Wert für das Matrixelement $\langle s | \frac{\partial^2 \hat{H}(Q)}{\partial Q_R \partial Q_K} | g \rangle$. Ein Vergleich zwischen Deoxy-Mb und Met-Mb-CN (Tabelle (9)) bestätigt dies.

Die Ramanlinie 1603 cm^{-1} bei $\text{Ni}(\text{OEP})$ Abb. (20b) entspricht der Spinmarkerlinie 1564 cm^{-1} (Deoxy-Mb) bzw. 1580 cm^{-1} (Met-Mb-CN, Met-Hb-CN). Ihre Normalschwingung transformiert sich wie A_{2g} in der D_{4h} -Symmetrie und setzt sich zusammen aus den Streckschwingungen $C_\alpha - C_m$, $C_\alpha - C_\beta$ und den Knickschwingungen $C_m - H$. Die N_{Pyrrol} -Atome haben sehr kleine Amplituden und schwingen senkrecht zur Verbindungslinie $\text{Fe}-N_{\text{Pyrrol}}$. Deshalb ist hier ein schwacher Einfluß der Ligandierung auf die Verzerrung zu erwarten. In der Tat zeigt ein Vergleich zwischen Deoxy-Mb, Met-Mb-CN und Met-Hb-CN den geringen Einfluß des Liganden auf diese Ramanschwingung.

Die maximalen Amplituden fallen bei dieser Ramanlinie auf die äußeren Atome ($C_m - H$ und C_α). Die C_β -Atome schwingen mit kleinen Amplituden entlang der $C_\alpha - C_\beta$ -Verbindungslinie. Der Einfluß der Seitenketten auf diese Schwingung ist sehr gering. Deshalb kommen hier die Hauptverzerrungen B_{1g} und A_{2g} durch $C_\beta -$ und $C_m - H$ -Atome zustande.

Zusammenfassend läßt sich sagen:

- 1) Durch die Analyse verschiedener Ramanlinien eines Hämspektrums kann die Symmetrie des Häms bestimmt werden. Es ergibt sich für Deoxy-Mb die Symmetrie C_2 , für Met-Mb-CN, bzw. für Met-Hb-CN die Symmetrie C_s .
- 2) Statische Verzerrungen wirken auf verschiedene Ramanmoden unterschiedlich. Der Polarisierbarkeitstensor mit der niedrigsten Symmetrie beschreibt die aktuelle Symmetrie der prostetischen Gruppe.

3. Kristall-Lösungs-Problem

Aus den Meß- und Fitdaten für Deoxy-Mb und Met-Mb-CN in Lösungen und in Kristallen stellen wir fest, daß das Myoglobinmolekül in der Kristallform sich bezüglich der optischen Absorption und der Ramanstreuung wie das Molekül in Lösung verhält. Damit ist ein grundsätzliches Problem, nämlich der Einfluß der Kristallisation

auf das Hämolekül, hier indirekt behandelt. Die gute Anpassung zwischen den experimentellen und theoretischen Daten (Abb. (21, 22, 24, 25)) bestätigen unsere Schlußfolgerung über dieses Problem.

Die Eigenschaften des Hämoleküls in Lösung und im Kristall sind identisch, wenn a) keine pH-Abhängigkeit und b) keine oder sehr schwache Häm-Häm-Wechselwirkung durch das Kristallisieren auftritt. Eaton und Hochstrasser (23) zeigten durch polarisierte optische Absorption, daß eine Wechselwirkung zwischen benachbarten Hämgruppen im Myoglobinkristall vernachlässigbar schwach ist. Perutz und Eyck (67) stellten ebenfalls fest, daß die Kristallisation des Hämoglobins keinen Einfluß auf die physikalischen Eigenschaften des Häms hat.

Unsere Ergebnisse bestätigen diese Schlußfolgerung, soweit Änderungen des Häms betroffen sind.

Aus der Tatsache, daß die Raman-Tensoren in Lösung und Kristall für Deoxy-Mb bzw. Met-Mb-CN identisch sind, läßt sich schließen, daß solche Änderungen der Tertiärstruktur, die die molekularen Eigenschaften des Häms beeinflussen, durch Kristallisation hier nicht auftreten. Die beiden Derivate sind aber untereinander unterschiedlich. Eine Hämumorientierung wird durch das Ligandieren selbst verursacht (Takano (5,6), Simon et al. (50) und Deatherage et al. (49)), aber es tritt unseren Ergebnissen nach keine neue Umorientierung desselben Derivates durch Kristallisation auf.

4. Diskussion der optischen Absorption

4.1 Diskussion der Spektren

Die polarisierte optische Absorption an Mb-Kristallen in dem Bereich zwischen 450 und 700 nm (Abb. 17, 18)) zeigen, daß die Polarisationsverhältnisse zwischen der Soret- und der β -Bande konstant sind. Dies bedeutet, daß die optischen Übergänge

hier exakt x, y polarisiert sind. Die α -Bande besteht aus zwei Banden, nämlich der Q_0 -Bande, die durch einen $a_{2u} \rightarrow e_g$ ($0 \rightarrow 0$) Übergang verursacht wird und der vibronischen Seitenbande Q_v (β -Bande), die durch vibronische Kopplung zwischen Q und B-Zustand $a_{2u} \rightarrow e_g$ ($0 \rightarrow 1$) erzeugt wird (Gouterman (27)).

Die polarisierte optische Absorption zeigt, daß die Q_v -Bande x,y polarisiert ist, während die Q_0 -Bande eine x und y Aufspaltung aufweist. Dies ergibt sich aus dem Anstieg der Polarisationsverhältnisse im Bereich zwischen Q_v und Q_0 -Bande.

Die Aufspaltung der Soret- (B-) und α - (Q_0 -) Banden wurde an verschiedenen Mb- und Hb-Derivaten festgestellt (Eaton et al. (23, 51), Churg et al. (27), Makinen et al. (52)). Die Ursache hierfür ist die Aufhebung der Entartung des e_g -Orbitals des Porphyrins, die durch Symmetrieeerniedrigung des Hämoleküls zustande kommt. Da das Hämolekül wegen der unsymmetrischen Seitenketten keine D_{4h} -Symmetrie besitzt, ist die Entartung von vornherein aufgehoben und damit ist die Aufspaltung nicht auf den Kristalleinfluß auf das Hämolekül zurückzuführen.

Die Aufspaltung der Q-Bande ist in Deoxy-Mb stärker als bei Met-Mb-CN. Diese Aufspaltungen sind in Kristallen mit ausgeprägter (axb)-Fläche und in denen mit ausgeprägter (bxc)-Fläche zu beobachten. Die polarisierte optische Absorption an Mb-Kristallen mit ausgeprägter (axb)-Fläche ist empfindlicher als die mit ausgeprägter (bxc)-Fläche bezüglich der Polarisationsverhältnisse, da der Unterschied zwischen den optischen Dichten für die (axb)-Fläche ca. 3 mal größer als der für die (bxc)-Fläche ist. Dieser Unterschied entsteht durch die unterschiedliche Projektion des Übergangsdipolmomentes auf die Kristallachsen a, b und c*.

Die Polarisationsverhältnisse für Messungen an beiden Flächen sind in dem Wellenlängenbereich zwischen 430 nm und 540 nm nach unseren Ergebnissen konstant (Abb. (17, 18)). Daher wählen wir diesen Bereich zur Bestimmung der Hämnormalen und somit der Hämorientierung relativ zu den Kristallachsen. Dies wird im folgenden beschrieben.

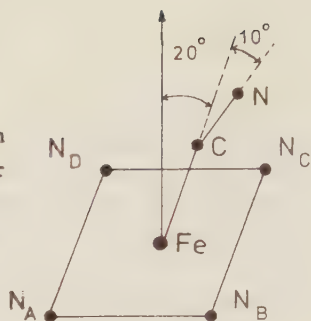
4.2 Hämorientierung

Die polarisierte optische Absorption an Mb-Kristallen ermöglicht die Bestimmung der Hämnormalen. Dies geschieht, indem man die optischen Dichten an zwei verschiedenen Kristallflächen mißt. Die Meßergebnisse zeigen, daß die Hämnormale für Deoxy-Mb im Bezug auf die Kristallachsen (a, b, c*) sich von der für Met-Mb-CN unterscheidet. Dieser Unterschied beträgt ca. 5° zwischen den beiden Richtungen der Hämnormalen. Dies bedeutet, daß das Absorptionsellipsoid des Hämoleküls sich durch das Ligandieren umorientiert. Ursache für dieses Verhalten ist die Bindungsgeometrie des Liganden zum Eisenatom einerseits und dem Kontakt zwischen dem Liganden und den Seitenketten des Apoproteins andererseits.

Im Deoxy-Mb ist das Eisenatom 5-fach koordiniert und ist um 0.42 Å von der Ebene der vier Stickstoffatome des Porphyrinringes entfernt. Dieser Abstand wird 0.55 Å, wenn wir die über alle Atome des Hämoleküls gemittelte Ebene betrachten (Takano (6)). Dies bedeutet, daß das Hämolekül gewölbt ist (d.h. die Symmetrie des Häms ist niedriger als D_{4h}). Ursache der Wölbung sind die vielen Kontakte zwischen den Seitenketten des Häms und den Seitenketten der Aminosäuregruppen des Proteins. Die wichtigsten sind: His E 7, Val E 11, PHE CD 1, His F 8, His FG 2 und Lys FG 4.

Durch das Ligandieren ändert sich die Hämgeometrie durch Änderung der bereits vorhandenen Kontakte und Erzeugung neuer zwischen dem Liganden und dem Protein. Bei Met-Hb-CN findet man Kontakte zwischen dem Liganden CN und His E 7 und Val E 11. Deatherage et al. (49) schlugen folgende Ligandengeometrie vor: Der CN-Ligand bildet keine lineare Bindung mit dem Eisenatom, sondern er hat eine gewinkelte Struktur. Der Winkel zwischen der Verbindungsline Fe-C und der Hämnormalen beträgt 20°. Die Verbindungsline C-N ist gegen die Fe-C-Linie um ca. 10° geneigt.

Diese Geometrie würde die optische Hämnormale gegenüber der Deoxy-Normalen drehen, da das CN-Molekül gewinkelt zur Hämnormale liegt und das kann die Häm-ebene verdrehen. Unsere Ergebnisse bestätigen, daß eine solche Verdrehung vorliegt.



Die Raman-Messungen an Mb-Kristallen ermöglichen die Bestimmung der Orientierung des Übergangsdipolmomentes in der Hämenebene. Dies war bis jetzt nicht möglich, da die optischen Messungen an den Kristallen durch die zwei Flächen (axb und bxc) begrenzt sind. Gleichung /40/ kann nicht gelöst werden, wenn ϵ_x , ϵ_y , ϵ_z und $\cos(i|L)$, ($i = x, y, z$, $L = a, b, c$), als variabel betrachtet werden. Das in IV § 3.3 beschriebene Verfahren macht es möglich, die Umorientierung im x- und y-Dipolübergang zwischen Deoxy-Mb und Met-Mb-CN zu bestimmen wenn die z-Achsen (die Hämnormale) bekannt sind. Abb. (32) zeigt den Unterschied zwischen den beiden Systemen.

Die Hauptachsen des Ramanstreuensensors im Met-Mb-CN sind um ca. 5° gegenüber denen im Deoxy-Mb gedreht. Diese Drehung ist auf die schräge Bindung des CN-Liganden an das Eisenatom und die Kontakte zwischen CN und Valin E 11 zurückzuführen.

4.3 Vergleich zwischen Deoxy-Mb und Met-Mb-CN

Die Unterschiede zwischen den beiden Derivaten Deoxy-Mb und Met-Mb-CN sind in Tabelle (10) zusammengefaßt.

Aus dem Fitverfahren erhielten wir in Übereinstimmung mit Takano (6) einen eindeutigen Unterschied in Bezug auf die Hämorientierung zwischen den beiden Derivaten. Dies führt zur Schlußfolgerung, daß unsere Methode zuverlässig ist und die Änderungen, die durch das Ligandieren auftreten, stark sind. Genaue Beschreibungen dieser Änderungen sind durch dieses Verfahren nicht möglich. Man kann in diesem Zusammenhang nur eine plausible Erklärung und Ähnlichkeitsschlußfolgerung ziehen.

	Deoxy-Mb	Met-Mb-CN	Referenz
Oxidation	Fe ⁺²	Fe ⁺³	Antonini, Brunori (3)
Spin	2	$\frac{1}{2}$	
Koordination	5	6	
Ligand-Protein-Kontakte	-	ValE11, HisE7	Deatherage et al. (49)
Molekulare Achsen	sind um ca. 5° gegeneinander gedreht		Diese Arbeit
pH-Abhängigkeit	unabhängig	unabhängig	Diese Arbeit
Symmetrie des Häm-moleküls	C _{2v} oder C _s	C _s	Diese Arbeit
Fitparameter	siehe Tabelle (6)		

Tabelle (10): Vergleich zwischen Deoxy-Mb und Met-Mb-CN

5. Diskussion der Abhängigkeit der Intensitätsprofile und der Depolarisationsgrade der Hämkomplexe vom pH-Wert der Lösungen

Der Einfluß der pH-Werte der Lösungen auf den Depolarisationsgrad (DPG) und die Intensitätsprofile (IP) eines Hämderivates wurden in dem pH-Bereich zwischen 4.0 und 9.0 untersucht. Alle DPG's und IP's der untersuchten Systeme, nämlich Deoxy-Mb, Met-Mb-CN und Met-Hb-CN zeigen in diesem pH-Bereich keine Variation. Dieser experimentelle Befund wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.1 Das Myoglobinsystem

Das Myoglobin ist ein monomeres Molekül und besitzt dadurch eine hyperbolische Sauerstoffsättigungskurve (Abb. 4). Seine Sauerstoffaffinität ist im pH-Bereich zwischen 5.0 und 7.4 für den Temperaturbereich zwischen 10° C und 37° C konstant (d.h. es zeigt keinen Bohreffekt). Für Temperaturen oberhalb von 37° C ergeben NMR-Messungen von La Mar et al. (11) zwar keinen Hinweis auf Änderungen der Tertiärstruktur im pH-Bereich oberhalb 7.0. Bei pH < 7.0 beobachteten sie dagegen Strukturänderungen. Sie interpretierten ihre Ergebnisse mit der Annahme, daß das proximale Histidin F 8 protoniert wird und dadurch eine tertiäre Strukturänderung induziert wird. Deoxy-Mb und Met-Mb-CN zeigen nach unseren Ergebnissen keine pH-Abhängigkeit bezüglich des DPG und der IP bei 10° C. Dies stimmt mit den Ergebnissen von La Mar et al. (11) überein.

Trotz der unterschiedlichen Tertiärstruktur und der unterschiedlich orientierten Absorptionsellipsoide verhalten sich Deoxy-Mb und Met-Mb-CN bezüglich der pH-Abhängigkeit gleich. Dies erfordert eine Erklärung.

Deoxy-Mb hat wegen des fehlenden Liganden weniger Kontaktstellen mit dem Protein als Met-Mb-CN. Deshalb ist es hier zu erwarten, daß der Einfluß der Strukturveränderung auf das Häm schwächer ist.

Met-Mb-CN enthält einen starken Liganden CN^- , der unter den Liganden der spektrochemischen Reihe, die nach zunehmendem Ligandenfeld geordnet sind, das stärkste Ligandenfeld besitzt (Großman et al. (53)). Met-Mb bindet CN^- mit größerer Affinität (Blanck et al. (54)). Die hier enthaltene freie Energie ΔG beträgt - 11.56 Kcal/Mol (Huang and Kassner (55)). Cho et al. (56) zeigten durch reversible Temperaturdenaturierung an Met-Mb im ligandierten und nicht ligandierten Zustand, daß das CN^- das Myoglobin um 3 Kcal/Mol stabiler als Met-Mb gegenüber Temperaturdenaturierung macht. Andere Liganden wie z.B. Azit (N_3^-) und Fluorid (F^-) stabilisieren es um 2 Kcal/Mol (Azit) bzw. 0.2 Kcal/Mol (Fluorid).

Außerdem wird das CN^- geneigt zur Hämnormale gebunden und zeigt somit eine Wechselwirkung mit den Aminosäuregruppen der E-Helix (distales Histidin E 7, Valin E 11), (Deatherage et al. (49)). Daraus können wir entnehmen, daß der Ligand (CN^-) durch seine starke Bindung an das Eisenatom einerseits und die Kontakte mit der E-Helix andererseits, die Hämgruppe fester an das Protein verankert. Dies bringt starke Verzerrungen der Hämgruppe mit sich. Eine durch den pH-Wert induzierte tertiäre Strukturänderung wird, energetisch bedingt, geringfügige Verzerrungen verursachen, die gegenüber den durch das CN^- erzeugten Verzerrungen zu vernachlässigen sind. Dies dürfte die Ursache dafür sein, daß das Met-Mb-CN bezüglich des DPG und der IF keine pH-Abhängigkeit zeigt.

Daraus läßt sich schlußfolgern:

1. Die durch den pH-Wert induzierte tertiäre Strukturänderung bei Myoglobin hat sehr schwachen Einfluß auf die Hämgruppe. Dies läßt sich wie folgt begründen:
 - a) Das Myoglobin zeigt einen sehr schwachen Bohreffekt.
 - b) Es treten durch Änderung des pH-Wertes keine zusätzlichen Hämverzerrungen auf.
2. Die Protonierung muß an einer von der Hämgruppe entfernten Aminosäuregruppe stattfinden, sonst würde man stärkere Verzerrungen des Häms beobachten. Mit unserer Meßmethode können

wir aber solche Protonierung nicht lokalisieren und somit keine zusätzliche Information über diese liefern.

5.2 Das Hämoglobinsystem

Die Quartärstruktur des Hämoglobins bestimmt die physiologische Funktion dieses Systems. Seine sigmoidische Sauerstoffsättigungskurve wird durch diese Struktur hervorgerufen. Dieses Sättigungsverhalten optimiert den Sauerstofftransport zwischen der Lunge und dem Gewebe. Änderungen in der Tertiär- und der Quartärstruktur, die im physiologischen Kreislauf durch verschiedene Effektoren (wie z.B. H^+ -Ionen, 2,3-Diphosphoglycerat, Inositol Hexaphosphat oder Temperaturverschiebung) verursacht werden können, haben einen großen Einfluß auf das Sättigungsverhalten des Hämoglobins. D.h. die Strukturänderungen sind, wie Röntgenuntersuchungen unter anderem gezeigt haben, ausgeprägter als die des Myoglobins. Resonante Ramanuntersuchungen an Oxy-Hb für verschiedene pH-Werte zeigen, daß die DPG's und die IP's verschiedener Ramanlinien dieses Systems sich drastisch mit dem pH-Wert ändern (Schweitzer et al. (32)). Im Gegensatz dazu zeigen die DPG-Dispersionskurven der 1355 cm^{-1} -Ramanlinie des Deoxy-Hb im alkalischen Bereich keine Abhängigkeit vom pH-Wert. Im sauren Bereich hingegen beeinflußt die Protonierung von Aminogruppen mit den pK-Werten 5.4 (distales Histidin) die DPG und die IP (Schweitzer-Stenner et al. (34)).

Shaanan (12) stellte durch Röntgenstrukturanalyse Unterschiede in der Tertiär- und der Quartärstruktur zwischen Oxy-Hb und Deoxy-Hb fest. Er bestätigte damit die Theorie von Perutz (18,57), in der die kooperative Sauerstoffbindung auf der Grundlage solcher Strukturänderungen interpretiert wird. Danach besteht der Hauptunterschied zwischen Oxy-Hb und Deoxy-Hb in einer Salzbrücke zwischen dem His HC 3(146 β) und dem ASP FG1 (94 β), die bei Deoxy-Hb aufgebaut und beim Übergang Deoxy-Hb $\rightarrow$ Oxy-Hb aufgebrochen wird. Dadurch entstehen Änderungen in der Tertiär- und Quartärstruktur, welche die Sauerstoffsättigung beeinflussen. Die oben erwähnte Salzbrückenbildung bei Deoxy-Hb verschiebt den

pK-Wert des Histidins (146 β) und somit kann diese Brücke eine große Rolle für den alkalischen Bohreffekt spielen (Perutz (18)).

Russu et al. (68) stellten anhand von ^1H NMR Untersuchungen an Hämoglobin fest, daß das Aufbrechen der Salzbrücke His (146 β) ASP (94 β) beim Übergang des Deoxy-Hb zum Oxy-Hb nicht immer, wie Perutz (18) behauptete, auftritt, sondern von verschiedenen Parametern, wie z.B. dem pH-Wert, der Ionenstärke und den anorganischen Phosphaten (2,3-Diphosphoglycerat und Inositol Hexaphosphat) abhängt. D.h. bei niedrigen Cl^- -Konzentrationen ist die Salzbrücke im Oxy-Hb noch vorhanden und kann mit Änderung des pH-Wertes der Oxy-Hb-Lösung aufgebrochen werden ($\text{pK} \approx 7.8$). Dadurch könnte die von Schweitzer et al. (32) gemessene pH-Abhängigkeit des DPG und der IP in Oxy-Hb schlüssiger interpretiert werden.

Im Gegensatz dazu zeigen die entsprechenden Ramanlinien des Met-Hb-CN bezüglich des DPG und der IP keine pH-Abhängigkeit (Abb. 35). Deatherage et al. (49) klärten anhand von Röntgenstrukturanalyse die Struktur von Met-Hb-CN auf. Sie stellten fest, daß die Tertiär- und die Quartärstruktur des Met-Hb sich stark nach dem Ligandieren mit CN^- ändern. Diese Strukturänderung wird durch die Kontakte zwischen dem Liganden und dem Apoprotein verursacht. Die Salzbrücke His (146 β) ASP (94 β) ist bei Met-Hb nicht vorhanden (Kilmartin et al. (69), Heidener et al. (70)). Deatherage et al. (49) fanden keinen Unterschied zwischen Met-Hb und Met-Hb-CN in der Gegend des C-Terminus der β -Ketten. Daraus können wir schlußfolgern, daß die erwähnte Salzbrücke im Met-Hb-CN nicht vorhanden ist. Damit könnte die pH-Unabhängigkeit des DPG und der IP im Met-Hb-CN geklärt werden. Wenn das Vorhandensein dieser Brücke hauptsächlich zur Strukturänderung durch den pH-Wert beiträgt, muß ihre Abwesenheit den pH-Effekt aufheben und das ist hier der Fall.

Außerdem muß noch geklärt werden, ob beim Übergang des Met-Hb zum ligandierten Met-Hb andere Salzbrücken aufbrechen, die eventuell zu einem kooperativen Bindungsverhalten des Met-Hb führen können.

Anusiem et al. (58) fanden, daß das Met-Hb das CN^- nicht kooperativ bindet. Sie erhielten eine Hill-Konstante $n = 1$ und stellten fest, daß die freie Energie für die CN-Bindung sehr leicht vom pH-Wert der Met-Hb-Lösung abhängt. Z.B. erhielten sie bei $\text{pH} = 6.0$ ein $\Delta G = -12.21$ Kcal/Mol und bei $\text{pH} = 7.8$ ein $\Delta G = -11.48$ Kcal/Mol.

Gibson et al. (59) fanden, daß α - und β -Ketten das CN^- mit gleicher Reaktionskonstante binden, während sie mit NO_2 und N_3^- unterschiedlich reagieren. Die Schlußfolgerung daraus ist, daß das Met-Hb das CN^- nicht kooperativ binden kann und sich somit genauso wie Met-Mb verhält.

Im Gegensatz dazu stellte Coleman (60) fest, daß das Met-Hb das CN^- kooperativ und zwar mit der Hill-Konstante $n = 1.4$ bindet. Er deutete darauf hin, daß sich das Met-Hb beim Reagieren mit dem CN^- ähnlich wie das Deoxy-Hb beim Reagieren mit dem O_2 verhält.

Banerjee et al. (61) fanden, daß das Met-Hb das Azid (N_3^-) und das Fluorid (F^-) ebenfalls kooperativ bindet. Die Hill-Konstanten sind hier pH-abhängig und liegen in dem Bereich zwischen $n = 0.92$ bis $n = 1.44$.

Daraus läßt sich schlußfolgern, daß die Kooperativität bei der Ligandbindung an Met-Hb noch umstritten ist. Gibt es sie tatsächlich, dann wäre sie viel kleiner als bei der des Oxy-Hb, da die Hill-Konstanten für Met-Hb $1 \leq n \leq 1.55$ wären und für Oxy-Hb $n = 2.9$ ist. D.h. die Strukturänderungen bei Met-Hb sind kleiner als die des Oxy-Hb.

Die frei werdende Bindungsenergie beim Ligandieren des Hämoglobins gibt ein Maß für die Stabilität der Ligandbindung an. Ihr Einfluß auf die pH-Abhängigkeit muß in diesem Rahmen diskutiert werden. In der Tabelle (11) sind die freien Energien ΔG für Mb und Hb zusammengefaßt.

	O ₂	CN ⁻	F ⁻	N ₃ ⁻	Referenzen
Hb	7.4 ^a	12.0 ^b	2.5 ^b	6.89 ^c	a = (63), b = (58) c = (72), d = (11)
Mb	11.74 ^d	11.56 ^e	2.45 ^f	5.67 ^g	e = (62), f = (54) g = (73)

Tabelle (11): Die freie Bindungsenergie ΔG in (- Kcal/Mol (monomer)) für Hb und Mb bei 20° C, pH = 7.0 und Ionenstärke zwischen 0.05 und 0.1

Aus dieser Tabelle ist es ersichtlich, daß die freien Bindungsenergien für das CN⁻ an Met-Hb und Met-Mb fast gleich sind. Dies bedeutet, daß die Quartärstruktur bei der Bindung keine große Rolle spielt und sich somit Met-Hb in dieser Beziehung genau wie Met-Mb verhält. Unsere Ergebnisse zeigen in der Tat, daß die beiden Systeme bezüglich des DPG und der IP fast identische Eigenschaften besitzen.

Hb und Mb zeigen unterschiedliches Sauerstoffsättigungsverhalten. Die Tabelle (11) zeigt, daß sich die freien Bindungsenergien für beide Systeme um ca. 3.5 Kcal/Mol unterscheiden. D.h. die Strukturänderung nimmt hier einen beträchtlichen Teil der freien Energie auf. Dies wurde ebenfalls von Guidotti (64) bestätigt, der fand, daß das mittlere $\Delta G \approx -24$ Kcal/Mol (tetramer) ist und bei getrennten Untereinheiten ($2\alpha + 2\beta$) $\Delta G \approx -32$ Kcal/Mol ($2\alpha + 2\beta$). Dies bedeutet, daß die mittlere Konformationsenergie ca. 8 Kcal/Mol (tetramer) beträgt.

Daraus können wir schließen, daß eine durch z.B. den pH-Wert induzierte Strukturänderung, wegen der unterschiedlichen Beiträge der Konformationsenergien, einen stärkeren Einfluß auf Oxy-Hb haben würde als auf Met-Hb-CN.

Abschließend können wir die pH-Unabhängigkeit des DPG und der IP im Deoxy-Mb, Met-Mb-CN und Met-Hb-CN wie folgt interpretieren:

- a) Die Salzbrücke His CH 3 (146 β) ASP FG 1 (94 β) ist im Spermi-Wal-Myoglobin sequenzbedingt nicht vorhanden. Ihre Abwesenheit wurde ebenfalls im Met-Hb-CN bewiesen. Es wurde hier auch erwähnt, daß ihr Aufbrechen im Oxy-Hb die pH-Abhängigkeit dieses Derivates bezüglich des DPG und der IP erklären kann. Neuere resonante Raman-Messungen an BME-Oxy-Hb bestätigen dies (Wedekind et al. (71)).

BME (Bis-N-Maleimido-Methyl-Ether) verbindet Cys F 9 (93 β) mit His FG 4 (97 β) der gleichen β -Untereinheit. Dadurch wird der Aufbau der erwähnten Salzbrücke verhindert. Die Sauerstoffsättigungskurve für Hb wird hyperbolisch (Hill-Konstante $n = 1$) und der Bohreffekt tritt nicht mehr auf (Simon und Königsberg (74), Simon et al. (75), Moffat et al. (76), Simon et al. (77)).

Im Gegensatz zu Oxy-Hb zeigen der DPG und die IP von BME-Oxy-Hb nur geringe pH-Abhängigkeit. Dies bestätigt die Schlußfolgerung, daß die untersuchten Derivate Deoxy-Mb, Met-Mb-CN und Met-Hb-CN keine pH-Abhängigkeit bezüglich des DPG und der IP zeigen, weil die Salzbrücke in den erwähnten Derivaten nicht vorhanden ist.

- b) Da die freie Bindungsenergie ΔG im Met-Hb-CN der des Met-Mb-CN fast gleich ist, muß die Quartärstruktur dieses Derivates eine untergeordnete Rolle bei der Bestimmung seiner physikalischen Eigenschaft spielen.

Abschließend soll noch erwähnt werden, daß auch andere Aminosäuregruppen an der Strukturänderung im Myoglobin und Hämoglobin beteiligt sind. Die pH-Unabhängigkeit der untersuchten Hämderivate zeigt aber, daß ihr Einfluß auf die Hämgruppe dieser Systeme klein ist.

VII Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Messung des Depolarisationsgrades und der Intensitätsprofile einer Ramanlinie eines Hämproteins und ihre Analyse anhand der beschriebenen Methode ein sehr gutes Verfahren zur Ermittlung der symmetrieklassifizierten Verzerrungen der Hämgruppe ist. Zur Erweiterung des Verständnisses über das Verhalten des Hämoleküls beim Ligan-dieren und bei Effektorbindung wäre es von Nutzen, folgende Problemstellungen zu behandeln:

1. Erweiterung des theoretischen Ansatzes

Keine der gemessenen Dispersionskurven des Depolarisationsgrades und der Intensitätsprofile konnte ohne komplexen Fitkonstanten

$\alpha_{e,s}^r$ gefittet werden. Dies ist erstaunlich, da in diesen Konstanten nur die Übergangsmatrixelemente des Dipol- und Herzberg-Teller-Operators eingehen. Diese sind aber bei Abwesenheit eines externen magnetischen Feldes stets reell. Schweitzer-Stenner et al. (34) haben darauf hingewiesen, daß durch die komplexen Parameter die Beiträge von Energienennern simuliert werden, die zu 5. Ordnungstermen des Polarisierbarkeitstensors gehören. In der Zwischenzeit hat es sich herausgestellt, daß die DPG's und die IP's von Oxy-Hb-Ramanlinien nur dann konsistent gefittet werden können, wenn in der Störungsrechnung noch die vibronische Kopplung eines nicht-Ramanaktiven Phonons zeitabhängig eingeht. Dies führt in der Tat zu einer zeitabhängigen Störungsrechnung in 5. Ordnung. Erste Rechnungen mit diesem erweiterten Ansatz (Schweitzer-Stenner et al. in Vorbereitung) zeigen, daß

- a) komplexe Fitkonstanten vermieden werden können
- b) für Oxy-Hb dieselbe pH-Abhängigkeit der Fitparameter ermittelt wird, wie die mit dem einfachen theoretischen Ansatz festgestellte (Schweitzer (35)).

D.h. aber: an der biophysikalischen Interpretation ändert sich durch die Erweiterung des theoretischen Ansatzes nichts.

Es erscheint daher sinnvoll, in Zukunft bei solchen Systemen, die kleine Maxima der Anregungsprofile zwischen α - und Soret-Bande aufweisen, in 5. Ordnung zu rechnen.

Deoxy-Mb, Met-Mb-CN und Met-Hb-CN zeigen solche Maxima jedoch nicht. Deshalb wird ihre erneute Rechnung mit erweitertem Ansatz nichts Neues bringen.

2. Druckinduzierte Symmetrie-Verzerrungen

Unter hohen hydrostatischen Drücken (bis 2500 Bar) zeigen Hämoglobin und Myoglobin reversible Änderungen der physikalischen und chemischen Eigenschaften.

Eine Verschiebung der optischen Spektren von Hämoglobin- und Myoglobinderivaten bei hohen Drücken wurde festgestellt (Gibson Q.H. et al. (80), Ogunmola et al. (79)).

Hämoglobin und Myoglobin zeigen unter hohen Drücken Veränderungen der Reaktionskinetik mit Liganden (Alberding (81), Sorensen (82)).

Morishima and Hara (83) stellten anhand von NMR-Studien an Hämoglobin unter hohem Druck fest, daß die Aminogruppen Val E11 β und His F8 β ihre Lage mit dem Druck ändern, während die α - Untereinheit keine Druckabhängigkeit in dieser Hinsicht zeigt.

Ramanmessungen an Hämproteinen unter hohen Drücken sind bis jetzt noch nicht durchgeführt worden. Wir erwarten, hiermit zusätzliche Hämverzerrungen erzeugen und diese mit Hilfe der beschriebenen Methode bestimmen zu können. Solche Studien sind physikalisch und biologisch von Bedeutung, da man zusätzliche Informationen über die Kopplung zwischen der Hämgruppe und dem Apoprotein gewinnen kann.

3. Raman-Messungen an Hämproteinen bei tiefen Temperaturen

Austin et al. (84), Parak et al. (85) und Frauenfelder et al. (86) sind der Dynamik des Myoglobins mit verschiedenen Experimentiermethoden nachgegangen. (Mössbauerspektroskopie, Reaktionskinetik, Röntgenanalyse u.a.). Sie stellten fest, daß die Hämproteine eigentlich keine feste Struktur besitzen, sondern niederfrequente Schwingungen (10^{-3} bis 10 cm^{-1}) um die Gleichgewichtslage ausführen (Konformationszwischenzustände). Diese Schwingungen werden bei tiefen Temperaturen (unter 80° K) eingefroren.

Die resonante Ramanstreuung verläuft wesentlich schneller als diese Konformationsschwankungen, d.h. wir sehen diese dynamischen Verzerrungen als statische Verzerrungen eines Scharmittels.

Röntgenuntersuchungen von Frauenfelder et al. (86) haben gezeigt, daß die mittlere quadratische Auslenkung der Hämatome bei tieferen Temperaturen abnimmt, die Atome des Moleküls werden in einer bestimmten Zahl von Konformationszwischenzuständen eingefroren. Wenn man davon ausgeht, daß ein Teil der von uns durch Ramanstreuung festgestellten statischen Verzerrungen als eine Mittelung über dynamische Fluktuationen verstanden werden kann, wäre bei tiefen Temperaturen eine Reduktion der Dispersion des Depolarisationsgrades zu erwarten. Messungen des DPG's und der IP's von resonanten Ramanlinien eines Hämproteinspektrums bei tiefen Temperaturen könnten daher zu einem tieferen Verständnis der Symmetrieverzerrungen der Hämgruppe führen. Entsprechende Experimente befinden sich im Stadium der Vorbereitung.

VIII. Zusammenfassung

Der Depolarisationsgrad einer Ramanlinie eines Hämproteinspektrums zeigt im Frequenzbereich zwischen α -, β - und Soret-Bande eine Dispersion. Weiterhin wurde für Oxy-Hb festgestellt, daß die Intensitätsprofile und die Dispersionskurven der Depolarisationsgrade der untersuchten Ramanlinien sich mit dem pH-Wert ändern. Zur Erklärung dieser Phänomene wurde ein theoretischer Ansatz von Schweitzer-Stenner et al. (34) verwendet, in dem der Polarisierbarkeitstensor als lineare Kombination aus allen Raman-tensoren aller erlaubten Ramanschwingungen, die sich in der D_{4h} -Symmetrie wie die Darstellungen A_{1g} , A_{2g} , B_{1g} und B_{2g} transformieren, zusammengesetzt wird. Die Konstanten dieser Tensoren stehen in linearer Beziehung zu den symmetrieklassifizierten statischen Verzerrungen der Hämgruppe.

Der Polarisierbarkeitstensor eines Hämproteins kann durch das Anpassen der gemessenen Intensitätsprofile und der Dispersionskurve des Depolarisationsgrades mit Hilfe eines Computerfitprogramms (Schweitzer (35)) ausgerechnet werden. Die so erhaltenen Fitkonstanten beschreiben diesen Tensor vollständig.

In dem erwähnten Fitverfahren verwendet man im allgemeinen eine relativ große Anzahl von Fitparametern. Dies macht die Eindeutigkeit der Ergebnisse zweifelhaft. Um die Eindeutigkeit der ermittelten Fitparameter festzustellen, wurden in dieser Arbeit Ramanmessungen an Deoxy-Myoglobin und Met-Myoglobin-Cyanid in Kristallen und in Lösungen durchgeführt. Aus diesen Messungen bekommt man zusätzliche experimentelle Datensätze (4 Intensitätsprofile von Kristallen) eines Myoglobinderivates, die theoretisch durch das Fitten der Intensitätsprofile und der Dispersionskurve des Depolarisationsgrades des gleichen Mb-Derivates in Lösung ausgerechnet werden können. Durch den Vergleich zwischen den experimentell ermittelten und den theoretisch berechneten Kristallintensitätsprofilen läßt sich die Eindeutigkeit der erhaltenen Fitparameter feststellen.

Myoglobin wurde hier für diesen Zweck verwendet, da es folgende Eigenschaften besitzt:

- a) Seine Intensitätsprofile und die Dispersionskurven seines Depolarisationsgrades ändern sich mit der Änderung des pH-Wertes der Lösung nicht. Dies ist eine wichtige Voraussetzung dafür, daß man Myoglobin im Kristall als identisch mit dem in der Lösung ansehen kann.
- b) Das kristallisierte Myoglobin weist keine Änderung der optischen Eigenschaften gegenüber dem in Lösung auf. Dies bedeutet, daß das kristallisierte Myoglobin als orientiertes Gasphasenmodell bei der Betrachtung der Ramanstreuung und der optischen Absorption aufgefaßt werden kann.

Daraus kann man schließen, daß sich das Hämolekül durch Kristallisation nicht verändert.

Für die theoretische Berechnung der Kristallintensitätsprofile werden die Richtungskosinus zwischen dem molekularen Achsensystem und dem Kristallachsensystem benötigt. Diese wurden durch die polarisierte optische Absorption und die Atomkoordinaten der vier Stickstoffatome des Porphyrinringes ermittelt. Mit Hilfe der polarisierten optischen Absorption wurden zuerst die Hämnormalen (z-Achse) für Deoxy-Mb und Met-Mb-CN-Kristalle bestimmt. Die x,y-Achsen wurden durch die Atomkoordinaten in erster Näherung festgelegt und dann mit Hilfe eines Rechenprogrammes exakt ermittelt.

Obwohl die beiden Myoglobinkristallderivate, Deoxy-Mb und Met-Mb-CN, aus dem gleichen Met-Mb-Kristall hergestellt wurden (d.h. sie besitzen einen identischen Kristallaufbau) stellten wir fest, daß die Hämgruppe durch die Ligandierung mit CN^- relativ zu dem unligandierten Zustand verdreht wird. Dies ergab sich aus der Bestimmung der Hämnormalen der beiden Derivate, die einen Winkel von ca. 5° zueinander bilden, und außerdem aus der theoretischen Berechnung der Kristallintensitätsprofile. Hier benötigen wir einen zusätzlichen Fitparameter in dem Richtungskosinus des molekularen Achsensystems, um den besten Fit zu erhalten.

Diese Verdrehung wird vermutlich durch die zusätzlichen Kontakte zwischen dem Liganden CN^- und dem Apoprotein erzeugt.

Die sieben unabhängigen experimentellen Datensätze (Depolarisationsgrad + 2 Intensitätsprofile aus der Lösung + 4 Kristallintensitätsprofile) konnten mittels des erwähnten Fitverfahrens mit einem einzigen Fitparametersatz theoretisch ausgerechnet werden. Somit ist es bewiesen, daß der hier verwendete theoretische Ansatz korrekt ist und die so erhaltenen Fitkonstanten eindeutig interpretierbar sind.

Aus den erhaltenen Fitparametern können wir folgende Schlußfolgerung ziehen:

- 1) Es treten bei Deoxy-Mb B_{1g} - und A_{2g} -Verzerrungen auf. Die Symmetrie der Hämgruppe ist hiermit auf C_2 erniedrigt. Ursache dafür sind die kovalente Bindung $\text{Fe}^{+2} - \text{His F8}$ und die verschiedenen Van der Waals-Kontakte zwischen der Hämgruppe und dem Apoprotein.
- 2) Bei Met-Mb-CN sind diese Verzerrungen quantitativ stärker als die des Deoxy-Mb. Hier treten zusätzliche Kontakte zwischen dem Liganden und dem Apoprotein auf, die diese Verzerrungen verstärken.
- 3) Die sehr gute Übereinstimmung zwischen den experimentellen und den theoretischen Kristallintensitätsprofilen bestätigt außerdem die Tatsache, daß die Kristallisation keinen Einfluß auf die physikalischen Eigenschaften der Hämgruppe hat.
- 4) Uns ist es gelungen, den Polarisierbarkeitstensor in der Hämebene zu orientieren. Bisher war nur eine Orientierung relativ zur Hämnormalen möglich.

Als Ergänzung zu resonanten Raman-Messungen an Deoxy-Mb, Met-Mb-CN in Lösungen in dem pH-Bereich zwischen 5.0 und 9.0 wurde Met-Hämoglobin-Cyanid (Met-Hb-CN) ebenfalls in diesem pH-Bereich untersucht. Die Dispersionskurven der Depolarisationsgrade und die

Intensitätsprofile aller untersuchten Hämderivate zeigen in diesem pH-Bereich und in dem Frequenzbereich zwischen α -, β - und Soret-Bande keine Variation. Dieser Befund wird anhand der in diesen Hämderivaten fehlenden Salzbrücke, His HC₃ (146 β) ASP FG1 (94 β), interpretiert.

Die Messungen an Met-Hb-CN zeigen außerdem, daß der Einfluß der Tertiär- und Quartärstrukturveränderungen auf die Hämgruppe im Gegensatz zum Oxy-Hb sehr klein sind.

Literaturverzeichnis

1. Perutz, M.F.; M.G. Rossmann, A.F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, Nature (London), 185 (1960) 416
2. Perutz, M.F.; H. Muirhead, S.M. Cox, L.C.G. Goaman. Nature (London), 219 (1968) 131-139
3. Antonini, E.; M. Brunori, "Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands", (A. Neuberger and E.L. Tatum, Eds) North-Holland publishing Company (1971), Amsterdam-London
4. Kendrew, J.C. and R.G. Parrish, Proc. Roy. Soc. (London), A 238 (1956) 305-324
5. Takano, T., J. Mol. Biol., 110 (1977) 537-568
6. Takano, T., J. Mol. Biol., 110 (1977) 569-584
7. Phillips, S.E.V., J. Mol. Biol., 142 (1980) 531-554
8. Karlson, P., "Biochemie" Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1970)
9. Dose, K., "Biochemie, eine Einführung" Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1980)
10. Weissbluth, M., in: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics 15 "Hemoglobin", Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1975)
11. La Mar, G.N.; D.L. Budd, H. Sick and K. Gersonde, Biochimica et Biophysica Acta, 537 (1978) 270-283
12. Shaanan, B., Nature, 296 (1982) 683
13. Theorell, H., Biochem. Z., 1 (1932) 252
14. Kendrew, J.C., Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A 62 (1950) 201
15. Kendrew, J.C.; H.C. Watson, B.E. Strandberg, R.E. Dickerson, D.C. Phillips, and V.C. Shore, Nature, 190 (1961) 663
16. Dickerson, R.E.; E. Richard, in: "The Proteins Bd. II" (H. Neurath Ed), Academic Press, New York and London (1964)
17. Perutz, M.F., J. Mol. Biol., 13 (1965) 648
18. Perutz, M.F., Nature, 228 (1970) 726-739
19. Suschtschinskij, M.M., "Ramanspektren von Molekülen und Kristallen", Heyden und Sohn GmbH, Rheine (1974)

20. Placzek, G., "Rayleigh-Streuung und Raman-Effekt" in: Handbuch der Radiologie, Bd. 6 (E. Marx Ed.), Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig (1934)
21. Loudon, R., "The Quantum Theory of Light" Clarendon Press, Oxford (1979)
22. Peticolas, W.; L. Nafie, P. Stein and B. Fanconi, J. Chem. Phys. 52 (1970) 1576
23. Eaton, W.E. and R.M. Hochstrasser, J. Chem. Phys. 49 (1968) 985
24. Fermi, G., J. Mol. Biol., 97 (1975) 237-256
25. Baldwin, G.M., J. Mol. Biol. 129 (1980) 103-128
26. Churg, A.K. and M.W. Makinen, J. Chem. Phys., 68 (1978) 1913
27. Gouterman, M., J. Chem. Phys. 30 (1959) 1139
28. Eaton, W.A. and J. Hofrichter, "Methods in Enzymology" Vol. 76 (E. Antonini, L. Rossi-Bernardi and E. Chiancone, Eds), Chap. 76, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco (1981)
29. Eaton, W.A., J. Hofrichter, L.K. Hanson and M.W. Makinen, Proc. Taniguchi Int. Sympo. Biophys., Lake Biwa, Japan, November (1974)
30. Asher, S., "Methods in Enzymologie" Vol. 76 (E. Antonini, L. Rossi-Bernardi and E. Chiancone, Eds), Chap. 76, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco (1981).
31. Collins, D.W.; D.B. Fitchen and A. Lewis, J. Chem. Phys., 59 (1973) 5714
32. Schweitzer, R.; W. Dreybrodt, A. Mayer and S. El Naggar, J. Raman Spectrosc., 13 (1982) 139-148
33. McClain, W.M., J. Chem. Phys. 55 (1971) 2789-2796
34. Schweitzer-Stenner, R.; W. Dreybrodt and S. El Naggar, Biophys. Struct. Mech., 110 (1984)
35. Schweitzer, R., "Untersuchung von pH-induzierten Symmetrieverzerrungen der prosthetischen Gruppe in Hämoglobin durch resonante Ramanstreuung", Dissertation (1983) Universität Bremen
36. Bennet, J.E.; J.F. Gibson and D.J.E. Ingram, Proc. Roy. Soc. (London), A 262 (1961) 395-408
37. Damen, T.C.; S.P.S. Porto and B. Tell, Phys. Rev. 142 (1966) 570-574

38. Loudon, R., *Le Journal de Physique*, 26 (1965) 677-683
39. Hofrichter, J. and W.A. Eaton, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 5 (1976) 511
40. Long, D.A., "Raman Spectroscopy" MacGraw-Hill International Book Company (1977)
41. Barret, J.J. and N.I. Adams III, *J. Opt. Soc. Am.*, 58 (1968) 311
42. Strekas, T.C. and T.G. Spiro, *BBA-Report*, 263 (1972) 830
43. Brunner, H.; A. Mayer and H. Sussner, *J. Mol. Biol.*, 70 (1972) 153
44. Spiro, T.G. and T.C. Strekas, *J. Am. Chem. Soc.*, 96 (1974) 338
45. Ogoshi, H.; Y. Saito and K. Nakamoto, *J. Chem. Phys.*, 57 (1972) 4194
46. Abe, M.; T. Kitagawa and Y. Kyogoku, *J. Chem. Phys.*, 69 (1978) 10
47. Schweitzer-Stenner, R.; W. Dreybrodt, D. Wedekind and S. El Naggar, zur Veröffentlichung in *Biophys. Struct. Mech.* (1984)
48. Warshel, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (1977) 1789
49. Deatherage, J.F.; R.S. Loe, C.M. Anderson and K. Moffat, *J. Mol. Biol.*, 104 (1976) 687-706
50. Simon, S.R.; W.H. Konigsberg, W. Beltin and M.F. Perutz, *J. Mol. Biol.*, 28 (1967) 451
51. Eaton, W.A.; L.K. Hanson, P.J. Stephens, J.C. Sutherland and J.B.R. Dunn, *Am. Chem. Soc.*, 100 (1978) 4991
52. Makinen, M.W.; A.K. Churg and H.A. Glick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 (1978) 2291
53. Großmann, G.; J. Fabian und H.-W. Kramer in "Lehrwerk Chemie" LB1 "Struktur und Bindung - Atome und Moleküle" Herausgeberkollektiv J. Finster et al., VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1978)
54. Blanck, J.; W. Graf und W. Scheler, *Acta biol. med. germ.*, Band 7 (1961) 323-326
55. Huang, Ya-Ping and R.J. Kassner, *Biophys. Chem.*, 256 (1981) 5327-5331
56. Cho, K.C.; H.T. Poon and C.L. Choy, *BBA*, 701 (1982) 206-215
57. Perutz, M.F., *Nature (London)*, 237 (1972) 495-499

58. Anusiem, A.C.; J.G. Beetlestone and D.H. Irvine, J. Chem. Soc. (A), (1968) 960-969
59. Gibson, Q.H.; L.J. Parkhurst and G. Geraci, J. Biol. Chem., 244 (1969) 4668-4676
60. Coleman, P.F., Biochem. Biophys. R. Commun., 74 (1977) 1544-1551
61. Banerjee, R.; J. Henry and R. Cassoly, Eur. J. Biochem., 32 (1973) 173-177
62. Blumenthal, D.C. and R.J. Kassner, J. Biol. Chem., 255 (1980) 5859-5863
63. Gibson, Q.H., J. Biol. Chem., 245 (1970) 3285-3288
64. Guidotti, G., in: "Genetical, Functional and Physical Studies of the Subunits of Hemoglobin" (T. Arends, G. Bemski and R.L. Nagel Eds), pp 113-122, S. Karger, Basel (1971)
65. Barron, L.D., Nature, 257 (1975) 372
66. Barron, L.D., Chem. Phys. Letters, 46 (1977) 579
67. Perutz, M.F. and L.F. Ten Eyck, Cold. Spring. Hrb. Symp., 36 (1971) 291-311
68. Russu, Irina M.; Nancy T. Ho and C. Ho, Biochem., 21 (1982) 5031-5043
69. Kilmartin, E.J.; J. H. Fogg and M.F. Perutz, Biochem., 19 (1980) 3189-3193
70. Heidener, E.J.; R.C. Ladener and M.F. Perutz, J. Mol. Biol., 104 (1976) 707-722
71. Wedekind, D.; W. Dreybrodt, R. Schweitzer-Stenner und S. El Naggar (unveröffentlichte Daten)
72. Anusiem, A.C.I. and R. Lumry, J. Am. Chem. Soc., 95 (1973) 904-908
73. Goldsack, D.E.; W.S. Eberlein und R.A. Alberty, J. Biol. Chem., 240 (1965) 4312
74. Simon, S.R. and W.H. Konigsberg, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 56 (1966) 749
75. Simon, S.R.; W.H. Konigsberg, A. Belton and M.F. Perutz, J. Mol. Biol., 28 (1967) 451
76. Moffat, J.K.; S.R. Simon and W.H. Konigsberg, J. Mol. Biol., 58 (1971) 89-101

77. Simon, S.R.; D.J. Arndt and W. Konigsberg, J. Mol. Biol., 58 (1971) 69-777
78. Karplus, M., in: "Hemoglobin and Oxygen Binding" (Chien Ho Ed) Elsevier North-Holland, Inc. (1982)
79. Ogunmola, G.B.; A. Zipp, F. Chen and W. Kauzman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 1-4
80. Gibson, Q.H. and F.C. Carey, Biochem. Biophys. Res. Commun., 67 (1975) 747- 751
81. Albrørding, N.A. "Pressure and Temperature Dependence of Myoglobin Kinetics", Doktorarbeit an der Universität Urbana, Illinois (1978)
82. Sorensen, L.B. "The Influence of Pressure on the Low Temperature Kinetics of Myoglobin", Doktorarbeit an der Universität Urbana, Illinois (1980)
83. Morishima, I. and M. Hara, J. Biol. Chem., 258 (1983) 14428-14432
84. Austin, R.H.; K.W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, Biochem., 14 (1975) 5355-5373
85. Parak, F.; E.N. Frolov, R.L. Mössbauer, J. Mol. Biol., 145 (1981) 825-833
86. Frauenfelder, H.; G.A. Petsko and D. Tsernoglou, Nature (London), 280 (1979) 558-563

Anhang I

Transformation des Ramanstreuensors vom molekularen Koordinatensystem (x, y, z) ins Kristallkoordinatensystem (a, b, c* $\hat{=}$ X, Y, Z)

Diese Transformation wurde im Kapitel I § 2.2.3 durch die Gleichung /30 a/

$$\hat{\beta}' = \hat{A} \cdot \hat{\beta}$$

zusammengefaßt. Hier soll diese zum besseren Verständnis ausführlicher behandelt werden.

Gleichung /12 /:

$$\beta_{LM} = \sum_{ik} n_{iL} \cdot n_{kM} \cdot \beta_{ik}$$

stellt die allgemeine Transformation des Streutensors dar. Zur Durchführung dieser Transformation werden die Richtungskosinus n_{iL} und n_{kM} benötigt. Diese sind in Tabelle (7) für Deoxy-Mb und Met-Mb-CN zusammengefaßt. Zur Vereinfachung werden hier die Richtungskosinus umbenannt:

$$n_{xX} = \cos(xa) \hat{=} l_1, \quad n_{xY} = \cos(xb) \hat{=} m_1, \quad n_{xZ} = \cos(xc^*) = n_1$$

$$n_{yX} = \cos(ya) \hat{=} l_2, \quad n_{yY} = \cos(yb) \hat{=} m_2, \quad n_{yZ} = \cos(yc^*) = n_2$$

$$n_{zX} = \cos(za) \hat{=} l_3, \quad n_{zY} = \cos(zb) \hat{=} m_3, \quad n_{zZ} = \cos(zc^*) = n_3$$

Aus Gleichung /12/ bekommt man mit der Einschränkung, daß L,M = X,Y und i,k = x,y sind ($\beta_{ik} = 0$, wenn i = z oder k = z ist. Durch die spezielle Meßgeometrie an der axb-Fläche des Mb-Kristalls werden nur Tensorkomponenten mit L,M = X,Y gemessen), die ausführliche Transformationsformel:

$$\begin{bmatrix} \beta_{xx} \\ \beta_{xy} \\ \beta_{yx} \\ \beta_{yy} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} l_1^2 & l_1 l_2 & l_2 l_1 & l_2^2 \\ l_1 m_1 & l_1 m_2 & l_2 m_1 & l_2 m_2 \\ m_1 l_1 & m_1 l_2 & m_2 l_1 & m_2 l_2 \\ m_1^2 & m_1 m_2 & m_2 m_1 & m_2^2 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \beta_{xx} \\ \beta_{xy} \\ \beta_{yx} \\ \beta_{yy} \end{bmatrix} / 30a /$$

Da die Einheitszelle des Mb-Kristalls Typ A zwei Häm-moleküle enthält, die durch Drehung um 180° um die y-Achse (b-Achse) des Kristalls ineinander überführt werden können, muß die Transformation in Gleichung /30a/ für diese zwei im Raum unterschiedlich orientierten Häm-moleküle berechnet werden. Wir bezeichnen das eine Häm-molekül mit dem Index (1) und das andere mit (2). Durch Drehung des Häm-moleküls um die y-Achse um 180° werden lediglich die Vorzeichen der Richtungskosinus seiner molekularen Achsen mit der X- und Z-Achse des Kristalls geändert, während diese mit der Y-Achse ihre Vorzeichen beibehalten. Für die in Gleichung /30a/ verwendeten Richtungskosinus gilt dann:

$$l_1^{(1)} = -l_1^{(2)}, m_1^{(1)} = m_1^{(2)}$$

$$l_2^{(1)} = -l_2^{(2)}, m_2^{(1)} = m_2^{(2)}$$

Nach Einsetzen dieser Beziehungen in Gleichung /30a/ erhält man folgende Beziehungen für die Tensorkomponenten der beiden Häm-moleküle im Kristallkoordinatensystem:

$$\beta_{xx}^{(1)} = \beta_{xx}^{(2)}, \beta_{xy}^{(1)} = -\beta_{xy}^{(2)}, \beta_{yx}^{(1)} = -\beta_{yx}^{(2)}, \beta_{yy}^{(1)} = \beta_{yy}^{(2)}.$$

Da aber die Raman-Intensität $\sim |\beta_{LM}|^2$ ist, liefern beide Moleküle gleiche unkohärente Intensitäten und somit konnte bei ihren Berechnungen nur eine Sorte von Häm-molekülen berücksichtigt werden.

Die Transformationsmatrix $\hat{A}$ läßt sich nach Einsetzen der Richtungskosinus aus Tabelle (7) ermitteln. Für Deoxy-Mb gilt:

$$l_1 = - 0.06 , m_1 = - 0.525$$

$$l_2 = + 0.466, m_2 = 0.738 .$$

Diese ergeben folgende Matrix:

$$\hat{A} = \begin{bmatrix} 0.0036 & - 0.028 & - 0.028 & 0.217 \\ 0.0315 & - 0.0443 & - 0.245 & 0.344 \\ 0.0315 & - 0.245 & - 0.0443 & 0.344 \\ 0.276 & - 0.388 & - 0.388 & 0.545 \end{bmatrix}$$

Für Met-Mb-CN gilt:

$$l_1 = - 0.12 , m_1 = 0.66$$

$$l_2 = 0.513, m_2 = 0.599 .$$

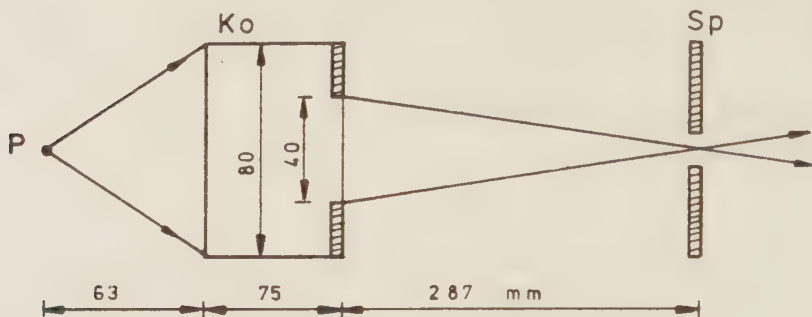
Diese liefern folgende Transformationsmatrix:

$$\hat{A} = \begin{bmatrix} 0.0144 & - 0.062 & - 0.062 & 0.263 \\ 0.0792 & - 0.072 & - 0.339 & 0.307 \\ 0.0792 & - 0.339 & - 0.072 & 0.307 \\ 0.436 & - 0.395 & - 0.395 & 0.359 \end{bmatrix} .$$

Anhang II

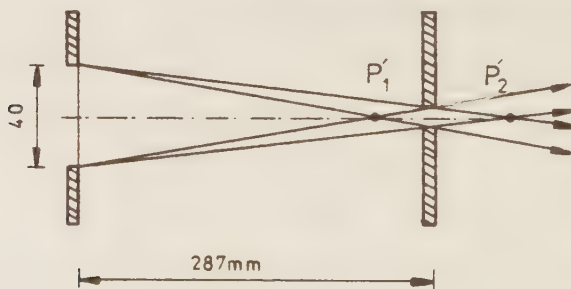
Berechnung der vom Spektrometer erfaßten Probendicke

Das verwendete Abbildungssystem der Ramanapparatur (Abb.10 (KO)) hat folgende Dimensionen:



P = Probe, KO = Linsensystem, SP = Eintrittsspalt

Das ins Spektrometer eindringende Strahlenbündel wird durch die Abbildungsgeometrie und die Spaltbreite (SP1) begrenzt. Die folgende Abbildung stellt das maximale Strahlenbündel dar.



Der Abstand $P'_1 - P'_2$ kann geometrisch berechnet werden. Dieser ist das Bild der maximal erfaßten Probendicke $P_1 - P_2$, die sich mit Hilfe der geometrischen Optik berechnen läßt.

Die erfaßte Probendicke für eine Spaltbreite von, 250 μm , beträgt in diesem Fall 0.344 mm.

Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt meinen Doktorvätern Herrn Prof. Dr. W. Dreybrodt, der durch seine intensive Betreuung, den kollegialen Stil seiner Mitarbeit, seine Bereitschaft zur Diskussion und durch seinen uneingeschränkten Beistand diese Arbeit stark gefördert hat und Herrn Prof. Dr. A. Mayer-Heinricy, der ebenfalls durch seine fruchtbare Diskussion der biophysikalischen Probleme und durch seinen wissenschaftlichen und menschlichen Beistand einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

Meine Kollegin, Frau Dipl.-Phys. D. Wedekind und meine Kollegen, Herr Dr. R. Schweitzer-Stenner und Herr Dipl.-Phys. D. Buhmann, sorgten durch ihre Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft für eine ideale wissenschaftliche und soziale Teamarbeit. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. S. Boseck danke ich für die Bereitstellung des Mikrophotometers (MPV). Ebenfalls gilt mein Dank Herrn R. Lasch für seine technische Betreuung.

Herr J. Laukner hat den größten Teil der in dieser Arbeit veröffentlichten Abbildungen gezeichnet. Herr G. Ankele hat neben der technischen Betreuung der Ramanapparatur durch seine Handfertigkeiten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Frau B. Bödeker hat diese Arbeit getippt. Allen gilt mein herzlicher Dank.

Lebens- und Bildungsgang

- geboren am 1.4.1947 in Geb Abbas/Syrien als Sohn des Bauern Kahddur El Naggar und seiner Frau Mariam
- Besuch der Grundschule in Salamieh/Syrien von 1954 bis 1960
- Besuch der Oberschule in Salamieh von 1960 bis 1963
- Besuch der erweiterten Oberschule in Salamieh von 1963 bis 1966, Abitur im August des Jahres 1966
- Studium der Elektrotechnik an der Aleppo-Universität/ Syrien von 1966 bis September 1967
Studium wurde wegen Delegation in die DDR abgebrochen.
- Erlernen der deutschen Sprache am Herder-Institut in Leipzig von September 1967 bis Juli 1968
- ab August 1967 Studium der Physik an der Technischen Universität Dresden
- Hauptprüfung am 2.5.1972
- Abschluß des Studiums mit einer Diplomarbeit über die "Herstellung und Untersuchung neuer Exo-Elektronen-Emitter in keramischer Form zum Einsatz in der Personendosimetrie" im Rahmen der Arbeitsgruppe "Angewandte Radioaktivität" unter der Leitung von Frau Prof. Dr. L. Herforth
- Erlangung des akademischen Grades eines Diplom-Physikers am 23.10.1972

- Einstellung als Physiklehrer in einer erweiterten Oberschule in Salamieh/Syrien von Januar 1973 bis August 1975
- Wehrdienst in der syrischen Armee von August 1975 bis September 1978
- Einstellung als Physiklehrer in einer erweiterten Oberschule in Homs/Syrien von September 1978 bis August 1980
- ab September 1980 Doktorand an der Universität Bremen
- Einstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Bremen ab 1.9.1981, seit September 1980 Arbeit an einer Promotion über resonante Raman-Spektroskopie an Hämproteinen unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Dreybrodt und Herrn Prof. Dr. A. Mayer-Heinricy

(Saad El Dine El Naggar)

